

ALINE DAVET

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DO CACTO – *Cereus jamacaru* DE
CANDOLLE, CACTACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel
Co-orientadora: Prof. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2005

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel e Profa. Dra. Marilis Dalarmi Miguel, pelas infinitas discussões sobre o verdadeiro espírito científico e pelos desafios propostos.

À As Ervas Curam Indústria Farmacêutica Ltda. pelo apoio financeiro e por disponibilizar a infra-estrutura; em especial aos farmacêuticos Aldo Cândido Dadalt, pelo incentivo e confiança, Robson Cândido Dadalt, pelo apoio técnico e dedicação, e Selma A. de Moraes Barros, pela palavra de consolo e ao técnico-químico Fabio da Silva Barbosa, pela disposição e presteza.

Ao amigo Prof. João Luiz de Souza Carvalho, pelo incansável apoio e pelo espírito otimista de um cientista em tempo integral.

À EMBRAPA do Semi-Árido, em especial ao cientista Prof. Dr. Viseldo R. de Oliveira, pelas amostras de *C. jamacaru* e pelo apoio com as exsiccatas.

Às amigas Suzane e Josiane pelo ombro amigo, pelo ouvido à disposição e pelas sugestões.

Aos amigos Cassyano, Julio César e Mauro pela filosofia, pelos churrascos e pela cerveja.

Às amigas Andrezza e Geni pelo apoio microbiológico.

Ao farmacêutico Jessé pela cromatografia gasosa.

A Milena pela colaboração nos ensaios de alelopatia.

Ao Prof. Dr. Alfredo R. Marques de Oliveira, pelo apoio e sugestões durante as atividades de síntese.

À Prof. Dra. Ana Luisa Lordello pelo apoio e dedicação com os espectros de RNM e IV.

À Prof. Dra. Marilu Lopes pela disposição e apoio.

Aos colegas do laboratório de Fitoquímica, em especial Hilda e Carina, pela

companhia nos domingos e nas férias.

À Universidade Federal do Paraná, em especial à Coordenação e aos professores da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo esforço e dedicação para o sucesso do programa.

Aos meus pais, à minha irmã e aos meus amigos, pela compreensão nos dias de mau-humor.

Obrigada!

***“Mandacarú quando fulorá na seca
É um sinal que a chuva chega no sertão
Toda menina que enjoa da boneca
É sinal de que o amor já chegou no coração”***

O Xote das Meninas
(Zé Dantas e Luiz Gonzaga)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	5
3.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	9
3.3 USOS POPULARES.....	11
3.4 ASPECTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO.....	11
3.5 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS.....	20
3.6 OUTRAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	24
4.2 ANÁLISES	26
4.3 ENSAIO SISTEMÁTICO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	26
4.3.1 Extrato Hidroalcoólico a 20 %.....	26
4.3.1.1 Pesquisa de Alcalóides.....	27
4.3.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas.....	27
4.3.1.3 Pesquisa de Heterosídeos Flavônicos.....	28
4.3.1.4 Pesquisa de Cumarinas.....	29
4.3.1.5 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos.....	30
4.3.1.6 Pesquisa de Esteróides e/ou Triterpenos.....	30
4.3.2 Extrato Aquoso a 20 %.....	33
4.3.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Antocianicos.....	33
4.3.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos.....	34
4.3.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos.....	34
4.3.2.4 Pesquisa de Taninos.....	35
4.3.2.5 Pesquisa de Aminogrupos.....	36
4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	36
4.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.....	38
4.6 OBTENÇÃO DO RESÍDUO SECO.....	41
4.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	41
4.7.1 CCD para visualização de alcalóides.....	41

4.7.2 CCD para visualização de flavonóides.....	42
4.7.3 CCD para visualização de esteróides.....	42
4.8 EXTRATO BRUTO AMOSTRA COMERCIAL (EB2).....	42
4.8.1 Fracionamento do EB2.....	43
4.9 EXTRATO BRUTO AMOSTRA EMBRAPA – LENHO (EBLE).....	43
4.9.1 Fracionamento do EBLE.....	43
4.9.1.1 Fração Hexano.....	44
4.10 EXTRATO BRUTO AMOSTRA EMBRAPA – CÓRTEX (EBCO).....	44
4.10.1 Fracionamento do EBCO.....	45
4.10.1.1 Fração Hexano.....	45
4.11 METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE ESTERÓIDES POR CG.....	45
4.12 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE EM CLAE.....	46
4.12.1 Desenvolvimento de metodologia isocrática para análise dos padrões da série homóloga tirosina, tiramina e hordenina.....	47
4.12.2 Preparo da fase móvel com acetonitrila.....	49
4.12.3 Preparo da solução de padrões de referência tirosina, tiramina e hordenina.....	50
4.12.4 Análise de amostra de <i>Cereus jamacaru</i> por CLAE.....	50
4.12.5 Síntese de N-metiltiramina.....	51
4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	53
4.13.1 Difusão em ágar.....	54
4.13.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	55
4.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	56
4.15 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1 RESULTADOS DO ENSAIO SISTEMÁTICO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	59
5.2 RESULTADOS DA ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E SUAS FRAÇÕES.....	61
5.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES COM OS EXTRATOS BRUTOS.....	61
5.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES COM AS FRAÇÕES HEXANO.....	65
5.4.1 Fração hexano do extrato bruto de lenho da amostra EMBRAPA.....	65
5.4.2 Fração hexano do extrato bruto de córtex da amostra EMBRAPA.....	69
5.5 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE EM CLAE.....	69
5.5.1 Análise dos padrões da série homóloga tirosina, tiramina e hordenina.....	69
5.5.2 Análise do produto da síntese da N-metiltiramina.....	70
5.6 RESULTADOS DAS ANÁLISES POR CLAE.....	74
5.6.1 Extratos brutos.....	74
5.6.2 Frações Hidroalcoólicas remanescentes.....	75
5.7 RESULTADO DAS ANÁLISES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	79
5.7.1 Difusão em ágar.....	79
5.7.2 Concentração inibitória mínima (MIC).....	81
5.7.2.1 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos.....	81
5.7.2.2 Atividade antimicrobiana da tiramina.....	83
5.8 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	84
5.8.1 Avaliação da atividade alelopática dos extratos brutos de córtex e de lenho da amostra EMBRAPA (EBCO e EBLE).....	84
5.8.1.1 Influência sobre o crescimento.....	84
5.8.1.2 Influência sobre a germinação.....	88

5.8.2 Avaliação da atividade alelopática da tiramina.....	88
5.8.2.1 Influência sobre o crescimento.....	88
5.8.2.2 Influência sobre a germinação.....	92
6 CONCLUSÃO.....	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
REFERÊNCIAS.....	98

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	COMPARATIVO DE CRESCIMENTO DE RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> INCUBADAS COM EBCO E ELE (CRESCIMENTO EM mm x CONCENTRAÇÃO EM mg).....	84
GRÁFICO 2 -	INFLUÊNCIA DA TIRAMINA SOBRE O CRESCIMENTO DE HIPOCÓTILO E RADÍCULA DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i>	89
GRÁFICO 3 -	INFLUÊNCIA DA INCUBAÇÃO COM TIRAMINA NO DESENVOLVIMENTO DE FOLÍOLOS EM SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> (NÚMERO DE FOLÍOLOS X CONCENTRAÇÃO mg).....	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FOTO DE <i>Cereus jamacaru</i> DC, CACTACEAE.....	7
FIGURA 2 -	DETALHES DAS HASTES DE <i>Cereus jamacaru</i> DC, CACTACEAE.....	8
FIGURA 3 -	FRUTOS DE MANDACARU.....	9
FIGURA 4 -	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA CACTACEAE.....	10
FIGURA 5 -	MANDACARU EM SEU AMBIENTE NATURAL.....	10
FIGURA 6 -	ESQUEMA DA BISSÍNTESE DOS ALCALÓIDES DERIVADOS DA TIROSINA.....	15
FIGURA 7 -	ESQUEMA DA BISSÍNTESE DA TIROSINA EM VEGETAIS.....	18
FIGURA 8 -	MATERIAL FORNECIDO PELA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO.....	25
FIGURA 9 -	DETALHE DA AMOSTRA ENVIADA PELA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO.....	25
FIGURA 10 -	APARELHO DE SOXHLET MODIFICADO PARA PREPARAÇÃO DE EXTRATOS.....	37
FIGURA 11 -	APARELHO DE SOXHLET ADAPTADO PARA PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	39
FIGURA 12 -	FLUXOGRAMA GERAL DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES A PARTIR DO E.B.....	40
FIGURA 13 -	INTERAÇÕES DE VAN DER WAALS ENTRE LAURIL SULFATO DE SÓDIO E COLUNA RP 18.....	48
FIGURA 14 -	ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA TIRAMINA NO UV.....	49
FIGURA 15 -	ESQUEMA GERAL DA SÍNTESE DE AMINAS SECUNDÁRIAS.....	51
FIGURA 16 -	REAÇÃO PARA A FORMAÇÃO DE N-METILTIRAMINA A PARTIR DA TIRAMINA E PARAFORMALDEÍDO.....	53
FIGURA 17 -	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DOS PRECIPITADOS DOS EXTRATOS BRUTOS COMERCIAL (EB2PPT01) E DA EMBRAPA (LEPPT01 E COPPT01).....	62
FIGURA 18 -	ESPECTROS DE INFRAVERMELHO PARA PADRÃO DE NITRATO DE SÓDIO.....	64
FIGURA 19 -	ESTRUTURA DO β -SITOSTEROL COM CARBONOS NUMERADOS.....	65
FIGURA 20 -	^{13}C -RNM DE LEHEX-01 E LEHEX-02.....	66
FIGURA 21 -	CG DOS PADRÕES ACETATO DE TOCOFEROL E β -SITOSTEROL (mVxmin).....	67

FIGURA 22 -	CROMATOGRAFIA GASOSA DE LEHEX-03 (mVxmin).....	68
FIGURA 23 -	CROMATOGRAFIA GASOSA DA FRAÇÃO HEXANO DA AMOSTRA DE CÓRTEX DA EMBRAPA (mVxmin).....	69
FIGURA 24 -	ANÁLISE POR CLAE DOS PADRÕES DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA (0,1 mg/mL), TIRAMINA (0,1 mg/mL) E HORDENINA (0,2 mg/mL) (AUxmin).....	70
FIGURA 25 -	CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DO PRODUTO DE SÍNTESE DE N- METILTIRAMINA POR CLAE (AUXmin).....	71
FIGURA 26 -	CCD CONFIRMATÓRIA DA SÍNTESE DE N-METILTIRAMINA.....	71
FIGURA 27 -	CO-INJEÇÃO DO PRODUTO DE SÍNTESE DE N-METILTIRAMINA E OS PADRÕES DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA E HORDENINA (AUxmin)	72
FIGURA 28 -	CROMATOGRAMA POR CLAE DE EB2 PARA ANÁLISE DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA (AUxmin).....	74
FIGURA 29 -	CROMATOGRAMA POR CLAE DE EB2-HIR PARA ANÁLISE DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA (AUxmin).....	77
FIGURA 30 -	CROMATOGRAMA POR CLAE DE EB2-HIR APÓS EXTRAÇÃO ÁCIDO- BASE PARA ANÁLISE DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA E HORDENINA (AUxmin).....	77
FIGURA 31 -	CROMATOGRAMA POR CLAE DE EB2-HIR APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA PARA ANÁLISE DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA E HORDENINA (AUxmin).....	78
FIGURA 32 -	COMPARATIVO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A <i>Escherichia coli</i>	80
FIGURA 33 -	COMPARATIVO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80
FIGURA 34 -	MIC DE CÓRTEX DE <i>Cereus jamacaru</i> SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81
FIGURA 35 -	MIC DE CÓRTEX DE <i>Cereus jamacaru</i> SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>Staphylococcus aureus</i>	81
FIGURA 36 -	MIC DE CÓRTEX DE <i>Cereus jamacaru</i> SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>Escherichia coli</i>	82

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

(1)	HORDENINA.....	11
(2)	MESCALINA.....	11
(3)	LOPHOPHORINA.....	12
(4)	MACROMERINA.....	12
(5)	EPINEFRINA.....	12
(6)	TIRAMINA.....	13
(7)	LUPEOL.....	13
(8)	β -SITOSTEROL.....	14
(9)	STIGMASTEROL.....	15
(10)	COLESTEROL.....	15

(11)	HORDENINA-O- α -L-RAMNOPIRANOSÍDEO.....	16
(12)	N-CIS-CAFEOILTIRAMINA.....	19
(13)	N-METILTIRAMINA.....	47

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Cereus jamacaru</i> DC, CACTACEAE SEGUNDO CRONQUIST E JOLY.....	6
QUADRO 2 -	IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>Cereus jamacaru</i>	38
QUADRO 3 -	CEPAS UTILIZADAS PARA A AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA.....	54
QUADRO 4 -	RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS BRUTOS COMERCIAL, DE LENHO E DE CÓRTEX DE <i>Cereus jamacaru</i>	61
QUADRO 5 -	PICOS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE IV DA AMOSTRA EB2PPT01...	63
QUADRO 6 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA CRESCIMENTO DE SEMENTES (<i>Lactuca sativa</i>) TRATADAS COM EBLE.....	86
QUADRO 7 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA CRESCIMENTO DE SEMENTES (<i>Lactuca sativa</i>) TRATADAS COM EBCO.....	87
QUADRO 8 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA CRESCIMENTO DE SEMENTES (<i>Lactuca sativa</i>) TRATADAS COM TIRAMINA.....	90
QUADRO 9 -	TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA FOLÍOLOS DE SEMENTES (<i>Lactuca sativa</i>) TRATADAS COM TIRAMINA.....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E AQUOSO A 20 % E DAS FRAÇÕES DA AMOSTRA COMERCIAL.....	59
TABELA 2 -	RESULTADOS DO ENSAIO SISTEMÁTICO EM FITOQUÍMICA COM EXTRATO AQUOSO A 20% DA AMOSTRA COMERCIAL.....	59
TABELA 3 -	RESULTADOS DO ENSAIO SISTEMÁTICO EM FITOQUÍMICA COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20 % DA AMOSTRA COMERCIAL E DE SUAS FRAÇÕES.....	60
TABELA 4 -	RESÍDUO SECO DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS BRUTOS DA AMOSTRA DE <i>Cereus jamacaru</i> COMERCIAL E DA EMBRAPA (LENHO E DE CÓRTEX)	61
TABELA 5 -	SINAIS DE ¹³ C – RNM DAS SUBSTÂNCIAS LEHEX01 E LEHEX02.....	65
TABELA 6 -	TEMPOS DE RETENÇÃO E ÁREAS DOS PICOS DOS PADRÕES TIROSINA 0,1 mg/mL, TIRAMINA 0,1 mg/mL e HORDENINA 0,2 mg/mL	73
TABELA 7 -	QUANTIFICAÇÃO POR CLAE DOS COMPONENTES DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA NAS AMOSTRAS DE EXTRATO BRUTO EBCO, EBLE E EB2.....	75
TABELA 8 -	RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO POR CLAE DAS SUBSTÂNCIAS DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA NAS FRAÇÕES HIDROALCOÓLICAS REMANESCENTES ANTES E DEPOIS DA EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE.....	76
TABELA 9 -	QUANTIDADE DAS SUBSTÂNCIAS DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA NAS AMOSTRAS DE <i>Cereus jamacaru</i> (mg/100g).....	79
TABELA 10 -	CONCENTRAÇÕES DE EBCO E EBLE EM RELAÇÃO AOS RESÍDUOS SECOS.....	79
TABELA 11 -	RESULTADOS DE MIC PARA EXTRATOS BRUTOS DE <i>Cereus jamacaru</i> (mg/mL).....	82
TABELA 12 -	RESULTADO DO TESTE DE MIC PARA TIRAMINA.....	83
TABELA 13 -	ANÁLISE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> APÓS SEIS DIAS INCUBADAS COM EBLE E EBCO, EM QUADRUPLICATA.....	88
TABELA 14 -	ANÁLISE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> APÓS SEIS DIAS INCUBADAS COM TIRAMINA, EM QUADRUPLICATA.....	92

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS, FÓRMULAS E ABREVIATURAS

(1)	RR = t_a/t_p (Cálculo de Retenção Relativa)
^{13}C RNM	Ressonância Nuclear Magnética de Carbono 13
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atm	Atmosfera
AU	Medida de intensidade em CLAE
C	Carbono
C.	<i>Cereus</i>
$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$	Tiramina
CaO	Óxido de Cálcio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrofotômetro de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO	Córtex
COO^-	Carboxila
CT	Cutícula
D.C.	De Candolle
E.B.	Extrato Bruto
EBLE	Extrato Bruto do Cerne do cacto
EBCO	Extrato Bruto da Polpa do cacto
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>et al.</i>	E colaboradores
FAET	Fração Acetato de Etila
FCLOR	Fração Clorofórmio do Extrato Hidroalcoólico a 20 %
FDCL	Fração Diclorometano
FHEX	Fração Hexano
FHIR	Fração Hidroalcoólica Remanescente
HCl	Ácido Clorídrico
IV	Infravermelho
kDa	Quilo-Dalton
LE	Lenho
m/v	Massa por volume
MAO	Mono-amino oxidase
ME	Medula
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
N	Normal
N°	Número
NEU	2-aminoetilbutirato
NH_4OH	Hidróxido de Amônio
P_2O_5	Óxido Fosfórico
Pt	Platina

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RP	Fase Reversa (<i>Reversed Phase</i>)
RR	Retenção relativa
SNC	Sistema Nervoso Central
SO ₃ ⁻	Ânion sulfato
<i>T.</i>	<i>Turbinicapus</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume

RESUMO

Cereus jamacaru De Candolle, Cactaceae, conhecido popularmente como mandacaru, é um cacto colunar comum no Brasil, especialmente na Região Semi-Árida. É especialmente importante no período de seca para a alimentação do gado bovino e caprino. Suas hastes são usadas popularmente no combate a diversas enfermidades, mas poucos estudos foram realizados sobre seu potencial farmacológico. Este trabalho é composto de três partes. PARTE I: Isolamento e identificação de compostos. Foram estudadas duas amostras de planta seca, uma comercial e uma obtida junto à EMBRAPA; esta última foi dividida em quatro partes, das quais duas (córtex e lenho) foram estudadas. A partir dos extratos hidroalcoólicos, foram isolados cristais de nitrato de sódio que correspondem a 0,18 % da massa da amostra comercial, 0,28 % do lenho e 0,32 % do córtex. Após fracionamento, a fração hexânica foi estudada quanto à sua composição em esteróides por metodologia em CG e ¹³C-RNM, sendo β-sitosterol o principal esteróide desta espécie. A partir do extrato hidroalcoólico do lenho foram obtidos 19,3 mg desta substância. PARTE II: Foi desenvolvido método em CLAE para quantificação da série homóloga tirosina, tiramina e hordenina e semi-quantificação de N-metiltiramina. A tiramina e a N-metiltiramina podem ser usadas como marcadores da espécie, sugerindo hidrólise ácida como método de extração destas substâncias. As análises das amostras levaram à identificação de N-metiltiramina e hordenina pela primeira vez na espécie. A amostra comercial possui 238,1 mg de N-metiltiramina em 100 g de planta seca; no lenho predominou a tiramina, com 28,41 mg em 100 g de planta seca. PARTE III: Análises biológicas. Os extratos hidroalcoólicos foram testados quanto ao potencial antimicrobiano, sendo o córtex mais efetivo contra *S. epidermidis* (MIC= 3,04 mg/mL), *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (MIC= 6,09 mg/mL). A tiramina apresentou atividade em MIC > 1000 mg/mL. Os extratos da amostra da EMBRAPA e a tiramina foram testados quanto ao potencial alelopático sobre a germinação e o crescimento de sementes de *Lactuca sativa*; todos influenciaram negativamente o desenvolvimento da semente, mas não tiveram ação sobre a germinação. Todas as concentrações de extratos inibiram os folíolos. As menores concentrações de inibição foram: 0,05 mg de extrato bruto de córtex sobre a radícula, 0,025 mg de extrato bruto de lenho sobre a radícula e 0,2 mg sobre o hipocótilo; 0,6 mg de tiramina sobre o hipocótilo e 0,3 mg sobre os folíolos. A tiramina apresentou atividade antimicrobiana e alelopática diferente dos extratos, o que indica que estas atividades dos extratos podem estar relacionadas a outras substâncias encontradas na planta.

Palavras-chave: tiramina; N-metiltiramina; hordenina; lauril sulfato de sódio; β-sitosterol; CLAE; microbiologia; alelopatia

ABSTRACT

Cereus jamacaru De Candolle, Cactaceae, popularly known as mandacaru, is a common columnar cactus in Brazil, mainly in the Semi-Arid Region. It's especially important during the driest months due to its use as cattle food. The stems are used to treat several diseases, but few studies concerning its pharmacological activity were developed. This research is divided in three parts. PART I: Isolation and identification of substances. Two samples were studied, a commercially obtained and a sample supplied by EMBRAPA, which was separated into four parts; only two of them were considered (wood and cortex of the stems). Sodium nitrate was isolated from all the hidroalcoholic extracts, corresponding to 0,18 % of the commercial sample weight, 0,28 % of the wood and 0,32 % of the cortex. The hexane fractions were studied on their steroidal composition using GC and ^{13}C -NMR technologies; β -sitosterol was found to be the main steroid in the species. From the wood 19,3 mg of this substance were isolated. PART II: A HPLC method was developed to quantify the series tyrosine, tyramine and hordenine, and the semi-quantification of N-methyltyramine. It is suggested that the acid hydrolysis is the ideal procedure to release the amines and purify the samples to the HPLC analysis. Tyramine and N-methyltyramine are then suggested as chemical markers. From the samples analysis it was found N-methyltyramine and hordenine for the first time in the species. The commercial sample had 238,1 mg of N-methyltyramine in 100 g of the dried plant; in the wood, tyramine was the main substance, 28,41 mg in 100 g of dried plant. PART III: Biological analysis. The antibacterial activity of the crude extracts was tested using Agar diffusion and MIC methods. The cortex showed the most effective activity against *S. epidermidis* (MIC= 3,04 mg/mL), *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (MIC= 6,09 mg/mL). Tyramine had MIC > 1000 mg/mL. The crude extracts and tyramine showed good allelopathic activity over *Lactuca sativa* seeds growth, but no effect on their germination. All the crude extracts concentrations were able to inhibit the development of the leaves. The minimal inhibitory concentrations were 0,05 mg of the cortex crude extract over the root, 0,025 mg of wood crude extract over the root and 0,2 mg over the shoot; tyramine's best activity was shown with 0,6 mg over the shoot and 0,3 mg over the leaves. The difference between the results shown by the extracts and tyramine in both biological activities suggests that other substances can be responsible for them.

Key-words: tyramine; N-methyltyramine; hordenine; laurel sodium sulfate; β -sitosterol; HPLC; microbiology; allelopathy.

1 INTRODUÇÃO

A comercialização de preparações exclusivamente a partir de plantas medicinais está prevista oficialmente no Brasil desde a primeira edição da Farmacopéia Brasileira, em 1929. Nesta ocasião, muitas plantas de uso popular foram incluídas neste compêndio e foram aceitas como sendo de uso tradicional, mesmo sem comprovação científica de sua eficácia e segurança de uso.

Em 1976 a Lei 6360 do Ministério da Saúde considerava a necessidade de registro para autorização de comercialização. O artigo número 23 determinava que todos os produtos inscritos nas farmacopéias brasileiras estavam isentos de registro. Desta forma, todas as plantas medicinais e as preparações indicadas na farmacopéia passaram a ser comercializadas livremente.

Mesmo após inúmeras tentativas de regularizar a comercialização de fitoterápicos, foi com a publicação da Portaria N° 6 de 1995 que o fitoterápico passou a ser classificado como medicamento.

A necessidade de estudos que demonstrassem segurança de uso e eficácia motivou a recém-criada ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou, em 24 de fevereiro de 2000, a RDC N° 17. Em seu anexo constavam os nomes de plantas medicinais com estudos suficientes para justificar a não apresentação de estudos de atividade biológica. Neste momento iniciava-se a nova visão do fitoterápico no Brasil: o fabricante seria responsável por comprovar as indicações e a dosagem, baseando-se na padronização com marcadores químicos, utilizando-os inclusive para o controle de qualidade.

A produção de medicamentos - regulamentada pela RDC N° 134 de 2001 e depois pela RDC N° 210 em 2003 – exigiu da indústria farmacêutica de fitoterápicos a adaptação também aos requisitos de controle em processo e Boas Práticas de Fabricação.

A exigência de padronização estimulou o investimento em estudos científicos de plantas medicinais e a maioria das empresas buscou registrar medicamentos desenvolvidos a partir de plantas conhecidas. Desta forma, plantas de origem européia, estudadas com recursos internacionais, foram o principal alvo das indústrias de fitoterápicos, uma vez que já havia substâncias ativas e marcadores identificados e padronizados. Assim, pesquisar plantas medicinais pouco comuns, mesmo que inscritas nas primeiras farmacopéias exigia muito investimento e não só os processos de registro tornaram-se inviáveis, mas também o controle de qualidade e a definição de dose diária e de risco ao usuário.

Em 16 de março de 2004, a ANVISA publicou a RDC N° 48, que revogava a RDC N° 17 e renovava a lista de medicamentos fitoterápicos cujo risco e eficácia estavam amplamente difundidos e cujo registro seria simplificado.

Ainda assim o registro de medicamentos produzidos a partir de plantas medicinais brasileiras exigia a reavaliação de investimentos para os estudos necessários para a regularização dos produtos. Dentre os fatores limitantes destacava-se a dificuldade de comunicação e entendimento entre a indústria e os fornecedores de matéria-prima vegetal, que deveriam, a partir daquele momento, entender que fazem parte de uma cadeia produtiva que tem como produto final um medicamento, devendo atender a requisitos de qualidade (MIGUEL e MIGUEL, 1999, p. 39). As conseqüências das dificuldades decorrentes da pouca qualidade da droga vegetal ultrapassam os aspectos de cultivo e coleta, levando a questões sanitárias, de manejo do solo, secagem e armazenamento. Muitos dos chamados produtores na verdade praticam o extrativismo e não identificam corretamente as espécies antes de coletá-las.

No Brasil destacam-se os programas de incentivo ao estudo da flora com vistas à agricultura e pecuária, especialmente com o objetivo de desenvolver a região Nordeste, que freqüentemente sofre com períodos de seca e fome. Esta região tem como símbolo o mandacaru, um cacto colunar cujos frutos são muito

apreciados na alimentação humana e cujas hastes são utilizadas para a alimentação do gado (ARAGÃO, 2000, p.898).

Este cacto, o *Cereus jamacaru* D.C., Cactaceae, ou *Pipthanthocereus jamacaru*, pode chegar a 10 m de altura e seu cerne é utilizado como matéria-prima para a fabricação de portas e janelas (SCHEINVAR, 1985, p.96). Em 1976, BRHUN e LINDGREN identificaram no mandacaru a presença do alcalóide tiramina, comum em outras espécies de cacto; não existem, no entanto, estudos direcionados para a comprovação científica dos usos populares desta planta (SCHEINVAR, 1985, p.103).

Desta forma, este trabalho justifica-se na medida em que inicia estudos para a caracterização do potencial medicinal do *Cereus jamacaru*; pouco estudado do ponto de vista químico esta planta é utilizada em diversos produtos encontrados no mercado brasileiro. Para tanto, propõe-se a identificação de substâncias, o estabelecimento e quantificação de marcadores químicos e a busca por substâncias biologicamente ativas, criando oportunidades para a industrialização e a comercialização de medicamentos seguros e de eficácia comprovada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo caracterizar quimicamente o cacto *Cereus jamacaru* D.C., Cactaceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Pretende-se:

- Identificar os constituintes químicos presentes nos extratos e frações de *Cereus jamacaru* por meio do desenvolvimento de novas técnicas cromatográficas e da otimização das já existentes;
- Sugerir substância marcadora;
- Desenvolver técnica em CLAE para quantificação da substância marcadora, que possa ser utilizada no controle de qualidade de *Cereus jamacaru*;
- Propor método para extração das substâncias marcadoras para uso na análise por CLAE
- Quantificar a substância marcadora utilizando o método desenvolvido
- Verificar o potencial biológico do extrato bruto e das substâncias puras identificadas, por meio de testes de atividade antimicrobiana e alelopática.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

As Cactáceas são dicotiledôneas suculentas de diversos hábitos, podendo ser árvores, arbustos, trepadeiras, epífitas ou geófitas; hastes (talos) podem ser colunares, roliços, globulares, tuberculados, em forma de costeletas, asas ou achatados, geralmente segmentados sem folhas e com espinhos. A família é composta de 100 gêneros e 1500 espécies, distribuídas quase exclusivamente nas regiões secas das Américas (BARTHLOTT e HUNT, 1993, p. 161-162).

Uma vez que as espécies desta família podem sobreviver em diversos meios, inclusive adversos, algumas adaptações metabólicas e estruturais são necessárias, como os sistemas radiculares superficiais e extensos, alta relação volume/superfície e células parenquimáticas especializadas em armazenar água (COSTA, 1997. p. 2).

A família está dividida em três subfamílias: *Opuntioideae* - apresenta espécies tipo árvore ou arbusto, com folhas, divididas em cinco gêneros; *Pereskioideae* – representada pelos gêneros *Pereskia* e *Maihuenia*; *Cactoideae* – a mais numerosa com 91 gêneros, geralmente árvores sem folhas ou com vestígios de folhas. As espécies da subfamília *Pereskioideae* apresentam hastes não suculentas, folhas grandes, aréolas axilares com espinhos; na subfamília *Opuntioideae* há hastes e folhas suculentas e aréolas axilares com espinhos; as *Cactoideae* não têm folhas, possuem hastes suculentas com aréolas bem desenvolvidas (BARTHLOTT e HUNT, 1993, p. 163).

O Gênero *Cereus* pertence à subfamília *Cactoideae*, grupo *Cereoideae*; compreende plantas tipo árvore ou arbustos de hastes (talos) eretos e significa, tanto em grego quanto em latim, “tocha”, provavelmente devido ao formato de candelabro do primeiro cacto conhecido. O Gênero *Cereus* foi primeiramente descrito por

Hermann, em 1698 e depois por Miller em 1754, e inclui 900 espécies publicadas. Em 1909, Riccobono dividiu o gênero e criou a denominação *Piptanthocereus*, hoje com 24 espécies. Estas espécies possuem flores, frutos e espinhos semelhantes e estão presentes desde as Índias até a América do Sul (BRITTON e ROSE, 1919, p.3).

O enquadramento taxonômico sugerido para o *Cereus jamacaru* De Candolle está representada no quadro 1 (CRONQUIST, 1981, p.xiii-xiv; JOLY, 1985, p.278-283).

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Cereus jamacaru* DC, CACTACEAE, SEGUNDO CRONQUIST E JOLY

	CRONQUIST	JOLY
Divisão	Magnoliophyta	Angiospermae
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledoneae
Subclasse	Caryophyllidae	Archichlamydeae
Ordem	Caryophyllales	Cactales (Opuntiales)
Família	Cactaceae	Cactaceae
Gênero	Cereus	Cereus
Espécie	<i>Cereus jamacaru</i>	<i>Cereus jamacaru</i>

Cereus jamacaru De Candolle possui os seguintes sinônimos científicos (BRITTON e ROSE, 1919, p.8): *Cereus glaucus* Salm-Dyck, *Cereus laetevirens* Salm-Dick, *Cereus lividus* Pfeiffer, *Cactus jamacaru* Kosteletzky, *Cereus horribarbis* Otto in Salm-Dick, *Cereus cauchinii* Rebut in schumann, *Piptanthocereus jamacaru* Riccobono, *Piptanthocereus jamacaru cyaneus* Riccobono e *Piptanthocereus jamacaru glaucus* Riccobono.

A planta, típica do Brasil, pode chegar a 10 metros de altura (figura 1), possui tronco lenhoso, muitas hastes eretas, formando topo compacto (figura 2). As hastes novas são azuladas e possuem de 4 a 6 costelas de ápices obtusos, separados por sulcos profundos. Quando em áreas abertas podem apresentar-se apenas com uma única haste. As aréolas são circulares distantes de 2 a 5 cm entre

si, sendo maiores no tronco principal. Os espinhos são radiais, podem ter de 9 a 30 cm de comprimento, sendo os centrais maiores; podem ter coloração amarela, avermelhada ou marrom (SCHEINVAR, 1985, p. 96; BRITTON e ROSE, 1919, p.8).

FIGURA 1 - FOTO DE *Cereus jamacaru* DC, CACTACEAE



FONTE: SIERRA e PESSOA, 2003. p. 90

FIGURA 2 – DETALHES DAS HASTES DE *Cereus jamacaru* DC, CACTACEAE



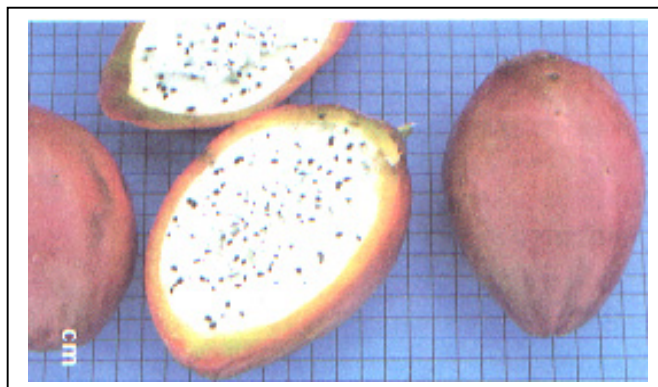
FONTE: LORENZI e MATOS, 2002, p. 109.

As flores são solitárias, noturnas, laterais a subapicais, brancas, de 20 a 30 cm de comprimento. O pericarpelo é cilíndrico, de 2 cm de comprimento, 1,6 cm de diâmetro, verde claro brilhante, recoberto de escamas largas e oblongas de cor verde escura. O tubo receptacular tem 12 a 14 cm de comprimento, é estriado, verde, bordos inteiros, até 12 cm de comprimento, verde na base e marrom-avermelhado na parte superior (SCHEINVAR, 1985, p. 99).

Os frutos são elipsóides, de 5 a 12 cm de comprimento e 7 a 12 cm de diâmetro, alaranjado ou vermelho-claro; pericarpo de aproximadamente 3 cm de

espessura, polpa branca, aroma suave, comestível, doce (SCHEINVAR, 1985, p. 101), conforme figura 3.

FIGURA 3 – FRUTOS DE MANDACARU



FONTE: LORENZI e MATOS, 2002, p. 109.

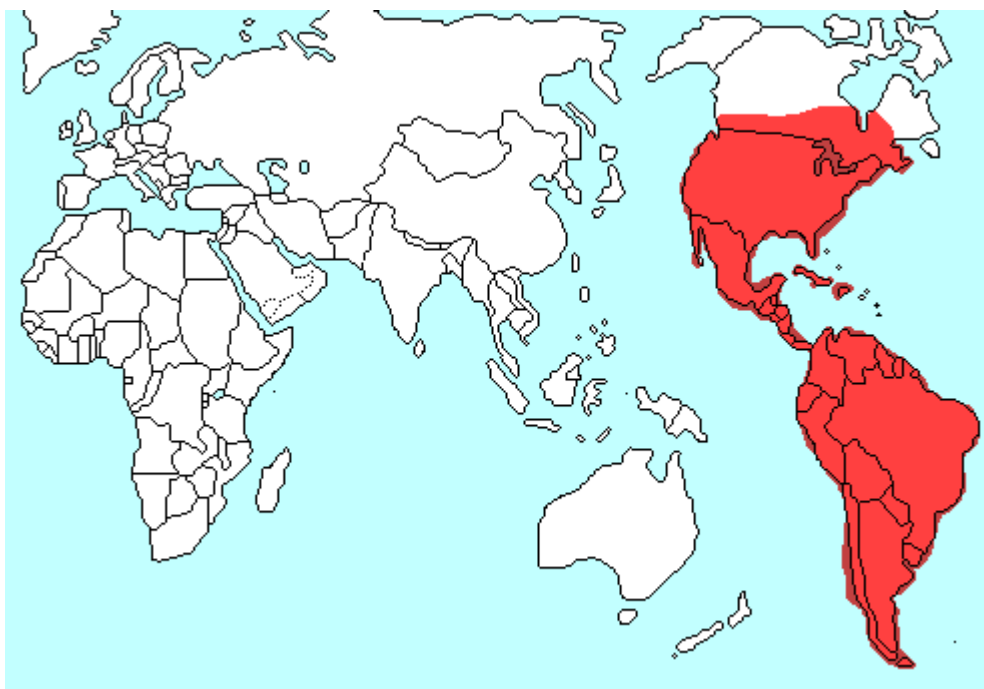
O tronco lenhoso pode chegar a 60 cm de diâmetro; é utilizado na fabricação de caixas, porta-retratos, portas e janelas (BRITTON e ROSE, 1919, p.9; BRAGA, s.d., p. 342).

Dentre os nomes vulgares mais comuns estão: mandacaru, mandacaru-de-boi, manacaru, nhamandacaru, cardeiro, cardeiro-rajado, facheiro, arumbeva e tuna. Do tupi “iamandaka-ru” – feixe de espinhos ou espinheiro (SCHEINVAR, 1985, p. 96, 101).

3.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A família Cactaceae está distribuída essencialmente nas Américas, conforme figura 4.

FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA CACTACEAE



FONTE: <http://www.omnicyber.org/Bio/Families/FamIndex.html>

O *Cereus jamacaru* é abundante na região nordeste do Brasil (conforme figura 5), da costa ao interior, sendo encontrada na Bahia, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas e Sergipe, desde o nível do mar até 900 m de altitude. É invasor de áreas úmidas, e já foi encontrado em Santa Catarina e em São Paulo (SCHEINVAR, 1985, p. 103).

FIGURA 5 – MANDACARU EM SEU AMBIENTE NATURAL



FONTE: www.brcactaceae.org

3.3 USOS POPULARES

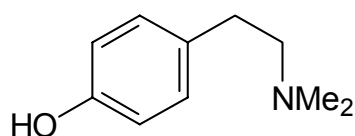
Na região semi-árida do Brasil, especialmente em anos de seca, são queimados os espinhos para que as hastes de mandacaru sejam utilizadas como alimento para o gado (BRITTON e ROSE, 1919, p. 9; MEDEIROS, SATHLER e GÓIS, 1994, p. 2; BRAGA, s.d., p. 342). Para reses, o vaqueiro retira os espinhos dos ramos novos com o facão; as mulheres rendeiras usam os espinhos como alfinetes nas almofadas (SCHEINVAR, 1985, p. 105).

Para o gado, o uso justifica-se pela capacidade de armazenar grande quantidade de água (15,84 %). A quantidade de proteína bruta chega a 10,72 % e o resíduo mineral a 10,66 %, dos quais 0,22 % são em P_2O_5 e 5,61 % em CaO (BRAGA, s.d., p. 342).

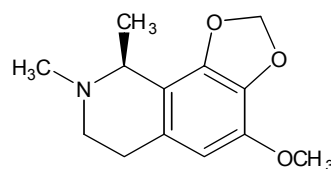
O uso medicinal popular é pouco difundido; diz-se que as raízes e o caule são diuréticos e melhoram males do coração. Toda a planta é usada no combate ao escorbuto e nas afecções do aparelho respiratório - bronquites, tosse, catarro (SCHEINVAR, 1985, p. 104).

3.4 ASPECTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO

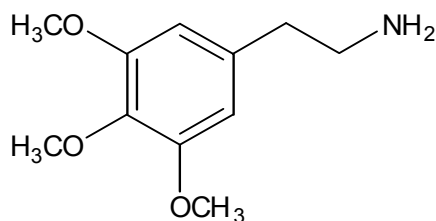
Dentre as substâncias mais freqüentemente encontradas nas Cactáceas estão os alcalóides feniletilamínicos, como a hordenina (1), a mescalina (2) e a lofoforina (3).



(1)



(2)



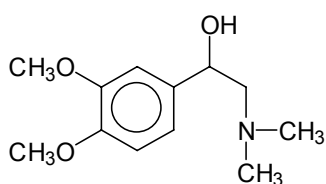
(3)

Alcalóides feniletilamínicos foram encontrados em *Echinocereus merkeri* em AGURELL, LUNDSTRÖM e MOSOUD (1969, p. 1413), que relataram a presença de N,N-dimetil-3,4-dimetoxifenetilamina pela primeira vez na natureza e a salsolina pela primeira vez em um cacto.

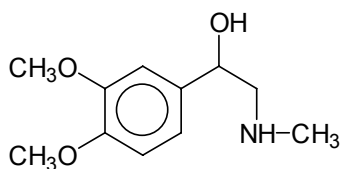
A partir de *Ariocarpus kotschoubeyanus* foram isoladas hordenina e N-metiltiramina (NEAL *et al.*, 1971. p. 447-448).

DINGERDISSEN e MCLAUGHLIN (1973, p. 1663-1666) deram continuidade ao estudo de *Dolichothele sphaerica* (*Mammillaria longimamma* var *sphaerica*) para isolamento de alcalóides. Foram isolados e identificados: N-metiltiramina, sinefrina, N-metilfenetilamina, na forma de hidrocloreto, β -O-metilsinefrina e β -O-etilsinefrina. Neste estudo, os pesquisadores chamam a atenção para o isolamento destas substâncias por não serem imidazóis, como a dolicoteina (N-isovaleril-histamina), encontrada anteriormente .

A macromerina (4) e a normacromerina foram isoladas de *Coryphantha calipensis* por BRHUN e ARUGELL (1974, p. 574-476); estas estruturas são muito semelhantes à epinefrina (5) e podem causar alucinações em animais.

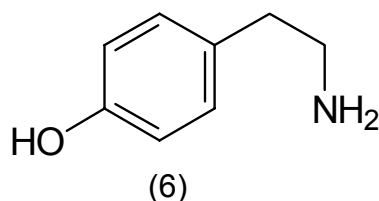


(4)



(5)

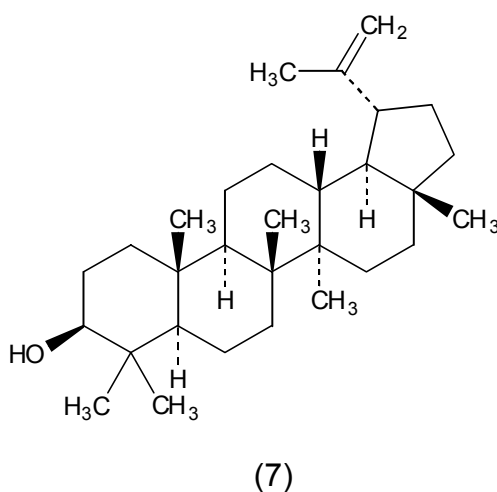
BRHUN e LINDGREN (1976, p. 175-177) identificaram tiramina – ou 2-p-hidroxifeniletilamina ($C_8H_{11}NO$) - em hastes frescas de *Cereus jamacaru*. A tiramina (6) é um cristal branco solúvel em água na proporção de 1 g para 95 mL a 15°C e em 10 mL de etanol em ebulição; levemente solúvel em benzeno e xileno; ponto de fusão: 164 -165 °C (THE MERCK INDEX, 1999).



Entre 1978 e 1983 vários artigos envolvendo o emprego de *Opuntia streptachanta* como agente hipoglicemiante, tendo sido comprovado em 1983 por Ibañez-Camacho (COSTA, 1997. p. 10).

MEYER e MCLAUGHLIN (1980, p.91-92) isolaram a candicina de *Trichocereus pasacana*. Esta substância é uma amina quaternária rara nas Cactáceas, cuja toxicidade pode ser comparada à da esticnina ou da nicotina. Tiramina, hordenina e N-metiltiramina também foram identificadas.

KIRCHER (1980, p. 2707-2712) identificou doze triterpenos no cacto *Stenocereus thurberi*. Dentre eles, o lupeol (7), betulina, calenduladiol, longispinogenina.



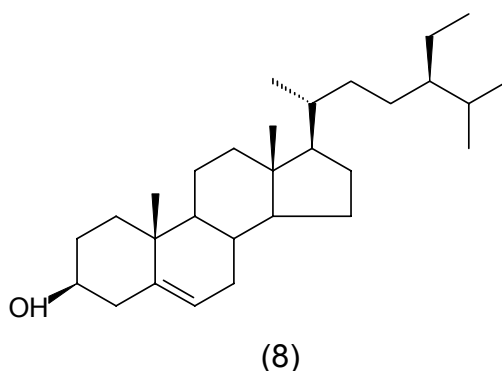
PUMMANGURA, MCLAUCHLIN e SCHIFFERDECKER (1991, p. 614) estudaram o cacto *Coryphantha missouriensis*, e isolaram e identificaram hordenina e N-metiltiramina (N,N-dimetiltiramina e N-metiltiramina, respectivamente) e identificaram a presença de tiramina na porção alcaloídica estudada.

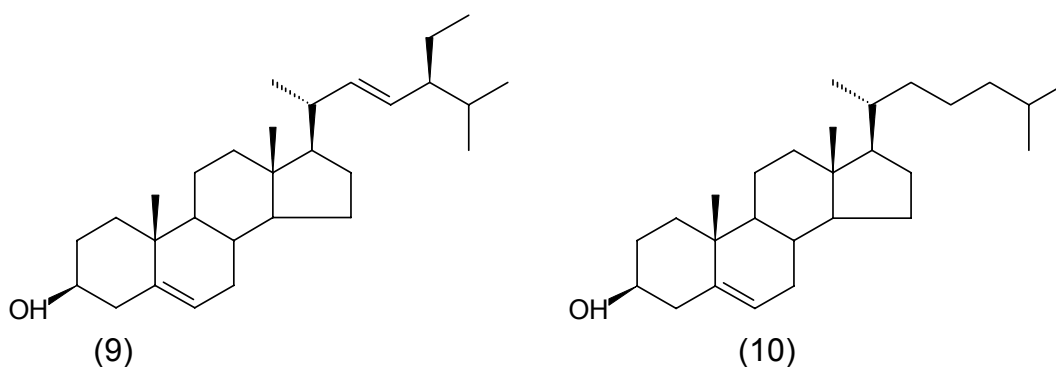
PETERSHOFER-HALBMAYER *et al.* (1982, p. 29-34) isolaram hordenina de *Selenicereus grandiflorus* e de *Selenicereus petranthus*. WAGNER e GREVEL (1982, p. 36-40) isolaram tiramina de *Selenicereus grandiflorus*.

Com o objetivo de estabelecer os a presença e a distribuição de flavonóides como fator para a quimiotaxonomia, BURRET, LEBRETON e VOIRIN (1982, p. 689) concluíram que a espécie *Cereus jamacaru* seria enquadrada no grupo *Cereoidae*, grupo caracterizado por não apresentar flavonas, há predominância de kampferol e de metil-3-flavonóis.

FERRIGNI *et al.* (1984, p. 839-845) identificaram alcalóides isoquinolínicos aromáticos oxigenados, seus análogos di e tetra-hidro e feniletilaminas em *Backebergia militari*.

SALT, TOCKER e ADLER (1987, p. 731-733) estudaram oito espécies de cactos com relação ao tipo de esteróides presentes. O esteróide predominante foi o β -sitosterol (24 α -etilcolest-5-en-3 β -ol) (8), seguido por 24 ξ -metilcolest-5-en-3 β -ol. Apenas quatro espécies continham stigmasterol (9) e seis tinham traços de colesterol (10). De maneira geral, as Cactáceas possuem Δ^5 -esteróis, predominantes nas Angiospermas; entre as Caryophyllales, no entanto, os cactos são exceção, visto que outras famílias desta ordem produzem predominantemente Δ^7 -esteróis.

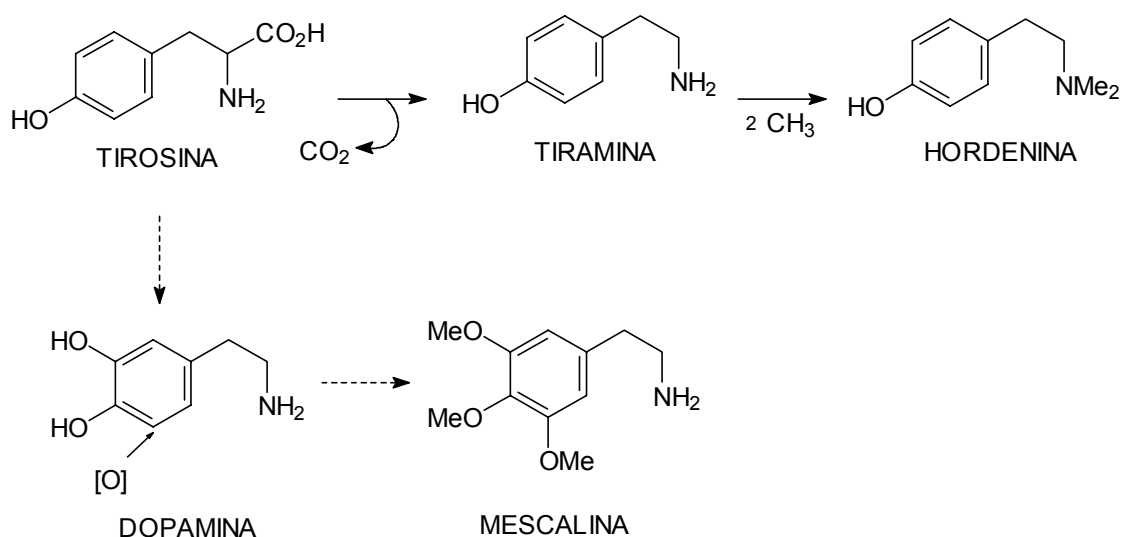




As lectinas MEAI e MEAII foram isoladas de *Machaerocereus eruca*; ambas são glicoproteínas oligoméricas com monômeros de 35 kDa e apresentaram alta concentração de glicina, ácido glutâmico e serina, tendo sido as primeiras lectinas isoladas de cactos (ZENTENO, DEBRAY e MONTREUIL, 1988. p. 95-100).

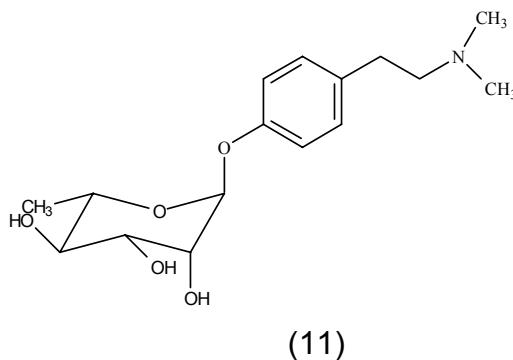
A tiramina é o primeiro alcalóide derivado da tirosina, sendo formada por simples descarboxilação (figura 6). A hordenina é resultado da metilação da tiramina; a mescalina é derivada da dopamina obtida a partir da tirosina (MANN, 1987. p.218, 219).

FIGURA 6 – ESQUEMA DA BIOSÍNTESE DOS ALCALÓIDES DERIVADOS DA TIROSINA



FONTE: MANN, 1987 p.218

Tiramina e hordenina também são encontradas em outras famílias de plantas, como na *Selaginella doederleinii* Hieron, Selaginellaceae, cujo uso está difundido na medicina oriental para o tratamento de doenças cardíacas; o extrato total dos alcalóides isolados desta planta apresentou atividade hipertensiva oral em ratos (LIN *et al.*, 1991, p. 188). Esta atividade foi verificada pelo aumento significativo na pressão arterial após 1 hora de administração (concentração de 0,5 mg/kg), com efeito máximo após 30 minutos da administração. Este estudo comprovou a atividade hipertensiva da hordenina via oral. Diferente do encontrado em outros estudos, os alcalóides estavam na forma glicosilada, como a hordenina-O- α -L-ramnopiranosídeo (11).



MAYWORM e SALATINO (1996, p. 201-209) caracterizaram o óleo extraído das sementes de *Cereus jamacaru*. Segundo os autores, há predomínio de ácidos graxos insaturados, destacando-se o ácido oléico (30,2%) e o ácido linoléico (43,4%); entre os saturados, predominam o ácido palmítico (14,6%) e o ácido esteárico (3,7%) do total. A composição obtida a partir das sementes de mandacaru assemelha-se à encontrada no óleo de soja, razão pela qual os autores sugerem potencial para uso comum entre as duas espécies.

A quimiotaxonomia com base nos n-alcanos presentes na cera que reveste as Cactáceas foi o objetivo do estudo de MAFFEI, MEREGALLI e SCANNERINI (1997, p. 241-253). Após a extração e identificação das ceras de 105 espécies, concluiu-se que a cera é composta de mistura de alcanos lineares cujas cadeias

variam entre 18 e 36 carbonos, representando 73 % do total. Em geral, predominamos alcanos com 31 e 33 carbonos. Após análise multivariada, foi proposto agrupamento das espécies entre as subfamílias Opuntioideae, Cereae e Cactoideae entre, de acordo com a predominância de alcanos.

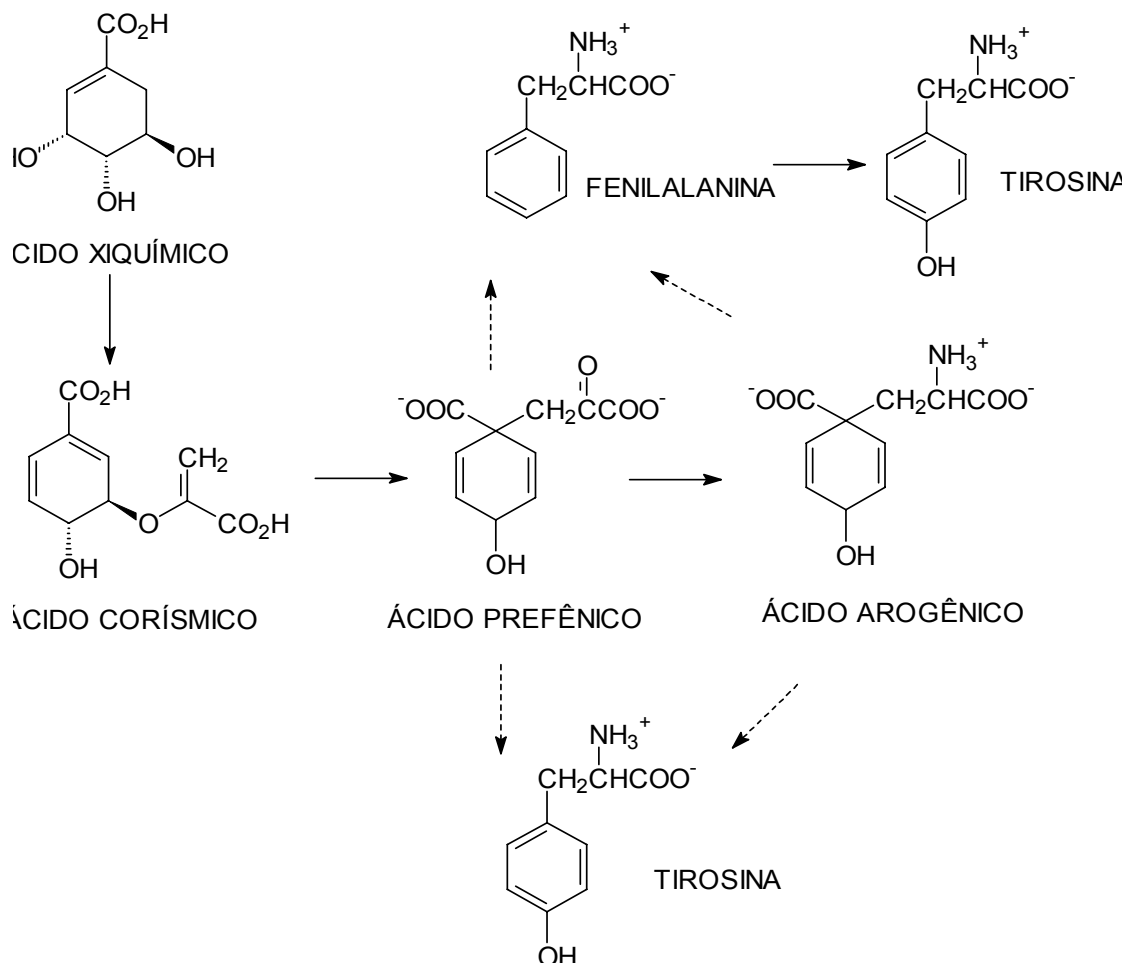
Com o objetivo de armazenar água como fator de sobrevivência em seu habitat, os cactos possuem substâncias mucilaginosas, cutículas espessas com revestimento ceroso e células epidérmicas geralmente lignificadas. A mucilagem de *Opuntia fulgida* foi a primeira mucilagem investigada quimicamente, apresentando arabinose, galactose, ramnose e ácido galacturônico (SANDS e KLASS¹, 1929).

O *Cereus peruvianus* apresentou alto teor de ácido galacturônico, chegando a 40 %, além de açúcares neutros como ramnose, galactose e arabinose (MINDT *et al*¹, 1975)

Os alcalóides feniletilamínicos das Cactáceas são derivados do metabolismo da tirosina. A tirosina é um aminoácido aromático sintetizado na via metabólica do xiquimato, podendo ser obtida a partir da fenilalanina ou a partir do ácido arogênico, cuja via metabólica é esclarecida na figura 7, de acordo com HIGUCHI (1997, p.140).

¹COSTA, S.C. **Cacto *Cereus peruvianus*: características estruturais, reológicas e aplicações dos polissacarídeos**. Curitiba: 1997. 202 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, p.4-6.

FIGURA 7 – ESQUEMA DA BIOSSÍNTESE DA TIROSINA EM VEGETAIS

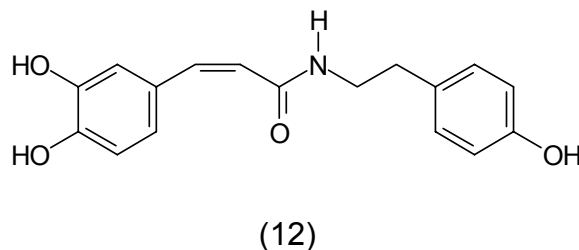


FONTE: HIGUCHI (1997, p.140).

Cereus fernambucensis, *Opuntia dilenii* e *Pilocereus arrabidaei* também apresentaram alcalóides feniletilamínicos (VALENTE, 1998, p. 122). Segundo este estudo, os extratos destas espécies de cacto não apresentaram atividade antitumoral tipo danificação de DNA e/ou inibição de enzimas Topoisomerase I e II de *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, o extrato de *P. arrabidaei* apresentou 75 % de inibição após 48 horas em teste *in vitro* para atividade tripanomicida.

Nas plantas, as aminas aromáticas também podem ser encontradas ligadas a compostos fenólicos, como o ácido ferúlico ou caféico. Esta ligação se dá pela

formação de uma amida, como na N-cis-cafeoil tiramina (12) encontrada na *Annona cherimola* (CHEN *et al.*, 1998, p. 1444).



STARCHA *et al.* (1999, p. 839-841) relataram a presença de alcalóides desta família em cactos do gênero *Turbinicarpus*: *T. schmiedeckianus* apresentou 5,46 (\pm 0,14) % de tiramina na fração total de alcalóides; *T. schmiedeckianus* var. *flaviflorus* apresentou 92,05 (\pm 0,71) % de hordenina; *T. pseudomacrolele* var. *krainzianus* apresentou 49,60 (\pm 0,55) % de hordenina, 2,48 (\pm 0,19) % de mescalina e 29,24 (\pm 0,04) % de anhalinina.

ARAGÃO *et al.* (2000, p. 897-903) caracterizaram a principal banda protéica de sementes de *Cereus jamacaru* como sendo 2S albumina de massa molecular 9,5 kDa, composta de uma cadeia polipeptídica pesada e uma leve. Esta proteína é rica em metionina, muito semelhante à castanha do Pará. Além disso, a alta relação entre a quantidade de nitrogênio e carbono indica que esta pode ser uma das formas de armazenamento de nitrogênio nas sementes de mandacaru.

MONJE e BARAN (2000, p. 457-460) identificaram a presença de oxalato de cálcio diidratado e de quartzo em um cacto (*Wigginsia tephroacantha*), incomum em sistemas biológicos.

Foi relatado que o cacto *Opuntia ficus-indica* possui em sua composição o esteróide β -sitosterol, justificando alguns de seus usos populares como auxiliar no tratamento de edemas e como antiinflamatório (PARK *et al.*, 2000, p.289).

PARK e CHUN (2001, p. 166) relataram a atividade cicatrizante de *Opuntia ficus-indica*, especialmente as frações hexânica e acetato de etila de extrato metanólico das hastes. As administrações foram tópicas em ratos.

O extrato etanólico de hastes de *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* apresentaram atividade anti-oxidante em vários ensaios; o extrato foi caracterizado como rico em compostos fenólicos (180,3 mg/g), provavelmente os responsáveis pela atividade relatada (LEE *et al.*, 2002. p. 6490-6496).

QIU *et al.* (2002, p. 1507-1510) relataram a atividade anti-radicaís livres de novas substâncias isoladas de hastes de *Opuntia dillenii*, como o opuntiosideo I, 4-etoxil-6-hidroximetil-alfa-pirona e kampferol – β – D - glucopiranosil - (1 \rightarrow 4) – β – D -glucopiranosídeo.

3.5 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

A tiramina e aminas relacionadas a ela agem de forma indireta, modificando o acúmulo e a liberação de norepinefrina nas terminações nervosas. Estas aminas permitem que a norepinefrina interaja com seus receptores, porque retiram o neurotransmissor das áreas de reserva nas vesículas sinápticas ou de locais de ligação extravesicular (GOODMAN e GILMAN, 1996. p.204).

Os compostos β -feniletilamínicos são a estrutura essencial para a atividade das aminas simpatomiméticas. A estrutura básica é composta de anel benzênico e cadeia etilamínica lateral (GOODMAN e GILMAN, 1996. p.200).

A tiramina não possui usos clínicos específicos e está presente em vários alimentos; normalmente é destruída pela MAO (mono-amino oxidase) no intestino, não atingindo o cérebro. A tiramina é um substrato para a MAO que, quando inibida, pode provocar efeitos adrenérgicos subidos pela simples ingestão de alimentos como o queijo ou o vinho. As ações periféricas das aminas simpatomiméticas são semelhantes às da noradrenalina, como broncodilatação, aumento da pressão

arterial e aumento da força de contração do miocárdio. Doses repetidas de tiramina (assim como ocorre com as anfetaminas) produzem respostas gradualmente menores provavelmente por depleção da noradrenalina de reserva (HANG *et al.*, 1997, p. 132-136).

A anfetamina é classificada como estimulante psicomotor, mas não é a única classe de substâncias presente em Cactáceas. Alucinógenos, como a mescalina e a hordenina. Outras substâncias sabidamente tóxicas encontradas na família são: anhalmina, anhalinina, anhalidina, anhalonidina, anhalonina, lofoforina e pelotina.

A mescalina, a anhalonina, a anhalonidina e a lofoforina causam depressão no Sistema Nervoso Central (SNC) em rãs e em mamíferos, podendo levar à morte por paralisia respiratória. A pelotina é convulsivante e produz alucinações coloridas, sendo usada por muitos com este objetivo (HENRY, 1949, p.160-161).

Dentre as espécies de cacto as mais conhecidas por suas propriedades alucinógenas são: *Lophophora williamsii* (o peiote mexicano), *Carnegiea gigantea*, *Coryphantha macromeris*, *Ariocarpus retusus*, *Mammillopsis senilis* (utilizado como cacto sagrado), *Mammillaria heyderi*, *Pachycereus pecten-aboriginum*.

Além dos usos conhecidos, diversos estudos têm-se destacado sobre o potencial das Cactáceas na terapêutica, dentre os quais pode-se destacar: HARTWELL que, em 1960 relatou a cura de adenocarcinoma abdominal pelo emprego de duas espécies de cacto (COSTA, 1977. p. 10). GALATI *et al.* (2001, p. 1-9) comprovaram a atividade de *Opuntia ficus-indica* como protetor da mucosa gástrica, confirmando o uso popular na Itália para o tratamento de úlcera gástrica; os autores atribuíram o efeito à presença de mucilagens. TAN *et al.* (2005, p. 287) indicaram atividade citotóxica *in vitro* de extrato metanólico de *Pereskia bleo* sobre células T-47D, provavelmente por indução de apoptose.

3.6 OUTRAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Especialmente devido ao conteúdo mucilaginoso, as Cactáceas são largamente utilizadas na cosmetologia e na tecnologia farmacêutica, mas o uso na agricultura sustentável ainda está restrito à alimentação, sem que sejam aproveitadas características do metabolismo (COSTA, 1997, p. 11). Neste contexto, atividades como a alelopatia tornam-se pontos fundamentais para o desenvolvimento com o uso racional dos recursos naturais (CRUZ, NOZAKI e BATISTA, 2001, p.1).

Segundo SOARES e VIEIRA (2000, p. 191), o termo alelopatia foi utilizado pela primeira vez por Molisch em 1937 e engloba as interferências causadas pela liberação de substâncias do metabolismo de seres vivos sobre outros. Estes metabólitos podem interferir no crescimento, germinação ou desenvolvimento das plantas, tornando-se extremamente útil do ponto de vista do cultivo de plantas. No caso de plantas medicinais, o interesse pela área tem crescido porque não só estes vegetais podem ser fontes de substâncias potencialmente alelopáticas, mas também outras plantas podem evitar o crescimento de pragas nas plantações por serem sensíveis a substâncias liberadas no meio.

As interações alelopáticas podem ser tanto estimulatórias quanto inibitórias, havendo especial interesse nas últimas; o acúmulo de substâncias pode ocorrer em qualquer órgão da planta, mas está especialmente nas folhas, sendo liberadas por exsudação, lixiviação ou volatilização (CRUZ, NOZAKI e BATISTA, 2001, p.3).

Não existem muitos estudos envolvendo a atividade alelopática de Cactáceas, mas algumas substâncias de seu metabolismo já foram avaliadas. Este é o caso da hordenina, alcalóide feniletilamínico encontrado na cevada e responsável por parte de sua atividade alelopática (LIU e LOVETT, 1993, p. 2232).

Algumas das substâncias encontradas nas Cactáceas, como a tiramina, são comuns em outros seres, como os microorganismos. Alimentos produzidos na

presença de microorganismos também contêm altos teores destas substâncias (SUZZI e GARDINI, .2003, p. 41-54). Desta forma, estes microorganismos possuem os sistemas enzimáticos para produção e eliminação de aminas; este fato pode justificar o baixo número de estudos envolvendo a atividade de Cactáceas sobre o desenvolvimento de microorganismos patogênicos, e o alto número de pesquisas envolvendo a produção de alimentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL:

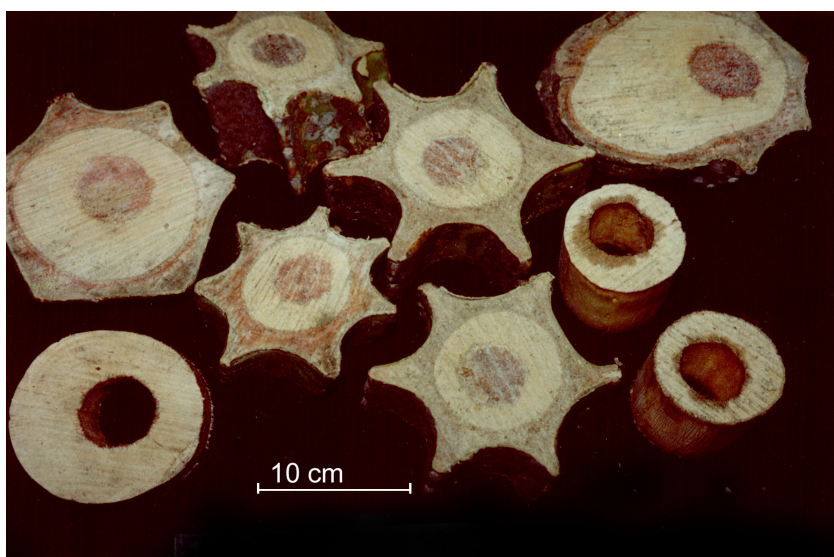
Foram obtidas amostras de partes aéreas de *Cereus jamacaru* DC, Cactaceae de dois tipos de fonte: primeiramente da cidade de Petrolina – PE com o auxílio do Projeto de Micropropagação de Mandacaru da EMBRAPA Semi-Árido – Pernambuco; e do Sertão da Bahia com o auxílio de fornecedor de matéria-prima vegetal para a indústria farmacêutica de fitoterápicos.

O material fornecido pela EMBRAPA está registrado no herbário desta instituição na cidade de Petrolina – PE, sob o número 2299. As hastes foram enviadas secas e estabilizadas, cortadas em pedaços. Cada pedaço foi separado em quatro partes: miolo, ou região vascularizada; lenho, região rígida anelar; córtex, correspondente à região de tecido parenquimatoso externo ao lenho; cutícula, correspondente à camada fina de cera que envolve toda a haste. Todos os pedaços estavam sem os espinhos.

A exsicata do material obtido a partir de fornecedor de matéria-prima vegetal para a indústria está registrada no Museu Botânico de Curitiba, sob o número 290431. O vegetal foi fornecido seco e estabilizado, em pedaços grandes de fácil identificação.

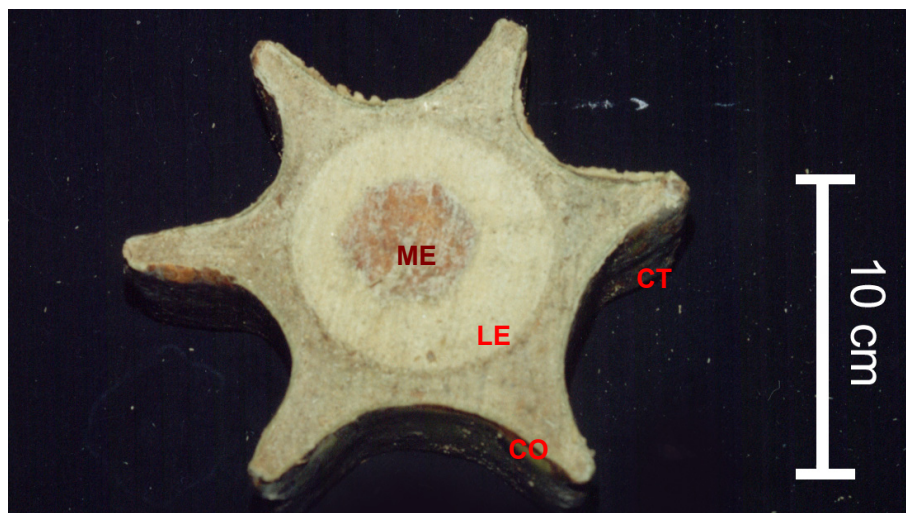
As figuras 8 e 9 apresentam o material vegetal fornecido pela EMBRAPA Semi-Árido.

FIGURA 8 – MATERIAL FORNECIDO PELA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO



FONTE: Davet, 2003

FIGURA 9 - DETALHE DA AMOSTRA ENVIADA PELA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO



FONTE: Davet, 2003

NOTA: Com o objetivo de facilitar a visualização das partes em que foram separadas as amostras, foram utilizados os seguintes códigos: LE (Lenho); CO (Córtex); ME (Medula); CT (Cutícula)

4.2 ANÁLISES:

O material vegetal foi moído em moinho de facas e martelos; parte do material foi encaminhada para análise sistemática preliminar (item 4.3) e parte para a identificação de substâncias e análises biológicas.

4.3 ENSAIO SISTEMÁTICO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA:

Para os ensaios fitoquímicos preliminares foi utilizada a marcha sistemática desenvolvida por MOREIRA (1979, p. 3-19). Para estes testes foi utilizada a amostra obtida de fornecedor comercial. Os resultados destas análises são utilizados como guias para o isolamento de substâncias, uma vez que informam os principais grupos de metabólitos presentes na amostra.

4.3.1 Extrato Hidroalcoólico a 20 %

O extrato hidroalcoólico a 20 % foi preparado por maceração de 40 g de material vegetal seco e estabilizado em 200 mL de álcool etílico a 70 % v/v, em banho-maria a 60 °C por 2 horas. O extrato foi filtrado em papel de filtro e particionado com duas porções de 30 mL de solventes com polaridade crescente: hexano, acetato de etila e clorofórmio, em funil de separação. Cada fração teve o volume completado para 200 mL com o próprio solvente e o resíduo do extrato foi denominado Fração Hidroalcoólica Remanescente, tendo seu volume completado para 200 mL com etanol. Todas as pesquisas de metabólitos foram realizadas com as quatro frações.

4.3.1.1 Pesquisa de Alcalóides

Uma alíquota de 50 mL de cada fração foi evaporada à secura; o resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol mais 20 mL de ácido clorídrico 1 %. Esta solução foi transferida para cinco tubos de ensaio em frações 1 mL, com os quais foi realizada a pesquisa de alcalóides com os reativos gerais.

- Reativo de Mayer: precipitado branco ou turvação branca indicam resultado positivo.
- Reativo de Dragendorff: precipitado de cor vermelho-tijolo indica reação positiva.
- Reativo de Bouchardat: formação de precipitado alaranjado indica reação positiva.
- Reativo de Bertrand: precipitado branco ou turvação branca indicam resultado positivo.

Foram realizados testes para confirmação dos resultados: os 15 mL restantes da fração foram transferidos para funil de separação e alcalinizados a pH 10 com hidróxido de amônio. A fração orgânica foi reunida e levada à secura em banho-maria a 60 °C (para a fração hidroalcoólica remanescente foi realizada extração com duas vezes de 15 mL de uma mistura de éter:clorofórmio (3:1)). A este resíduo foram adicionados 1 mL de álcool etílico e 5 mL de solução de ácido clorídrico a 1%; a solução foi aquecida levemente e dividida em cinco tubos de ensaio em frações de 1 mL; a pesquisa de alcalóides com reativos gerais foi repetida.

Nos tubos onde as reações forem positivas foram adicionados, lentamente, com agitação, 2 mL de solução etanólica de ácido tartárico a 5 %; caso a reação seja realmente positiva para alcalóides, o precipitado deve ser dissolvido.

4.3.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas

Foram transferidos para béquer 10 mL de cada fração, aos quais foram adicionadas cinco gotas de ácido clorídrico concentrado. O material foi levado à ebulição. Em caso de desenvolvimento de coloração vermelha, a reação é positiva para leucoantocianidinas.

4.3.1.3 Pesquisa de Heterosídeos Flavônicos

Foram transferidos para tubo de ensaio 5 mL de cada fração. Adicionaram-se 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. O desenvolvimento de coloração laranja indica a presença de flavonas, violácea indica a presença de flavanonas e vermelha indica a presença de flavonóis. Esta técnica apresenta uma limitação: as chalconas, as auronas e as isoflavonas não desenvolvem coloração, porém algumas chalconas em meio ácido produzem flavanonas.

a) Teste do Oxálico Bórico ou Reação de Taubock

Foram transferidos para cápsula de porcelana, 10 mL das frações e levados ao banho-maria até secura. Ao resíduo foram adicionadas cinco gotas de acetona e 30 mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1). Agitar e levar à secura; ao resíduo adicionar éter etílico. A presença de fluorescência sob radiação ultra-violeta indica reação positiva. Em geral, os flavonóis apresentam fluorescência amarelo-esverdeada, enquanto as flavanonas e isoflavanonas não apresentam esta propriedade; antociâncios apresentam cor, mas não produzem fluorescência.

b) Ensaio de Pacheco

Cerca de 10 mL das frações são transferidas para cápsula de porcelana e levadas ao banho-maria até secura. O resíduo foi aquecido em fogareiro e alguns cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético foram adicionados. Em seguida, 0,1 mL de ácido clorídrico concentrado foram adicionados. A produção de coloração roxa indica a presença de dihidroflavonóis.

c) Ensaio de Zinco em Ácido Clorídrico

Em um béquer (em banho de gelo) com 5 mL da fração foi adicionada uma pastilha de zinco e gotas de ácido clorídrico fumegante, cuidadosamente. A produção de coloração violeta indica presença de dihidroflavonóis. Flavanonas e flavanol não produzem coloração.

4.3.1.4 Pesquisa de Cumarinas

Foram transferidos para um béquer 50 mL da fração e foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico N; o volume foi reduzido a 10 mL em banho-maria a 60 °C. Ao resíduo foram adicionados 5 mL de água deionizada. No caso da fração hidoralcólica remanescente foi necessário fazer extração em funil de separação com três porções de 10 mL de éter etílico. A fase orgânica foi reduzida a 5 mL em banho-maria a 60 °C.

Em papel de filtro demarcado, foram colocadas três gotas do extrato orgânico, de modo que se formaram três manchas no papel. Depois de seco, foi adicionada uma gota de hidróxido de sódio N sobre as manchas 1 e 2. A mancha 2 foi encoberta por uma moeda; após observação do papel sob luz ultravioleta em ondas longas, a presença de fluorescência cor azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

Em um tubo de ensaio com 5 mL do extrato orgânico foram adicionados 2

mL de hidróxido de amônio SR, agitando. Após observação sob luz ultravioleta, a presença de fluorescência de azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

4.3.1.4 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos

Em um balão de fundo chato de 100 mL foram transferidos 30 mL da fração e adicionados 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10 %. O balão foi acoplado a um condensador e levado ao refluxo por 30 minutos. O extrato foi filtrado, ainda quente, por papel de filtro; ao filtrado foram adicionados 30 mL de água deionizada (para a fração remanescente, foi realizada extração com duas vezes de 10 mL de éter etílico em funil de separação). A fase orgânica foi separada e concentrada a 5 mL em banho-maria a 60 °C; os 5 mL foram transferidos para tubo de ensaio, aos quais foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de amônio N, com agitação leve. O desenvolvimento de coloração rósea-vermelha indica a presença de antraquinonas; o desenvolvimento de coloração violeta indica a presença de naftoquinonas e se houver desenvolvimento de coloração azul está indicada a presença de benzoquinonas.

4.3.1.5 Pesquisa de esteróides e/ou triterpenos

Foram reduzidos 30 mL de cada fração em banho-maria a 60 °C a 5 mL; os resíduos foram filtrados. No caso da fração hidroalcoólica remanescente, 30 mL foram levados à secura e ressolubilizados em 5 mL de clorofórmio. Foram pipetadas alíquotas de 0,1 mL, 0,5 mL e 1 mL da fração filtrada para tubos de ensaio e o volume foi completado para 2 mL com o solvente. A cada tubo foram adicionados 1 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (reação de Lieberman-Burchard). A produção de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação em C5 e C6. a coloração verde indica função hidroxila em C3 e dupla ligação em C5-C6; coloração amarela indica metila

em C14.

Para outros grupamentos, são realizadas reações específicas, conforme segue:

a) Preparo do extrato inicial:

A 50 mL das frações (exceto fração clorofórmio) adicionar 50 mL de água destilada e 5 mL de solução de acetato básico de chumbo a 10 %. Agitar e centrifugar; o sobrenadante deve ser transferido para funil de separação e extraído com 3 vezes de 10 mL de clorofórmio. Os extratos devem ser reunidos e concentrados em banho-maria a 40 °C até 15 mL. A fração clorofórmio deve ser analisada sem este procedimento. Com este extrato, realizar as reações que seguem.

b) Reação de Keller Kelliani

Transferir 2 mL do extrato clorofórmio a um tubo de ensaio e levar à secura. Dissolver o resíduo em 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. Transferir, cuidadosamente, a mistura para outro tubo que contenha ácido sulfúrico concentrado (2 mL). O desenvolvimento de coloração na zona de contato entre as fases indica a presença de esteróide – azul e triterpeno – verde.

c) Reação de Baljet

Em tubo de ensaio, adicionar a 2 mL do extrato clorofórmio volumes iguais da solução A (ácido pícrico a 5 % em etanol) e B (hidróxido de sódio a 10 %) – 1 mL de cada. O desenvolvimento de coloração alaranjada indica reação positiva para

geninas com anel lactônico pentagonal insaturado.

d) Reação de Tollens

Evaporar à secura 4 mL do extrato clorofórmio e adicionar ao resíduo 1 mL de piridina, 0,5 mL de solução aquosa de nitrato de prata a 10 %, 0,5 % de solução aquosa de hidróxido de sódio a 5 % e adicionar hidróxido de amônio até a dissolução do precipitado. Levar a solução à fervura. A formação do espelho de prata indica a insaturação no anel A ou B.

e) Reação de Kedde

Em um tubo de ensaio, 1 mL do extrato clorofórmio foram evaporados em banho-maria até secura. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de metanol e 1 mL da mistura do reativo A (ácido 3,5-dinitrobenzóico a 2 % em etanol) e B (solução aquosa de hidróxido de potássio a 6 %) foram adicionados. O desenvolvimento de coloração violácea ou azul (desaparece após 1 hora) indica reação de heterosídeos e geninas com anel lactônico insaturado.

f) Reação de Xantidrol

A 1 mL do extrato clorofórmio, adicionar 0,5 mL da mistura da solução de 0,125 % de Xatidrol em ácido acético glacial com 1 % de ácido clorídrico concentrado. O desenvolvimento de coloração avermelhada indica reação positiva.

g) Reação de Raymond ou de Marthoud

Em um tubo de ensaio, a 1 mL do extrato clorofórmio adicionar 1 a duas gotas

do reativo e 2 a três gotas da solução de hidróxido de sódio a 20 %. O desenvolvimento de coloração violácea ou azulada que desaparece rapidamente indica reação positiva para grupos metileno ativos e anel alfa-lactônico insaturado. Os carotenóides apresentam resultado positivo para este teste.

h) Reação de Legal

Levar à secura 1 mL do extrato clorofórmio e dissolver em piridina; adicionar 1 a duas gotas de nitroprussiato de sódio e uma pastilha de hidróxido de sódio. As lactonas sesquiterpênicas α - β insaturadas produzem coloração rósea neste ensaio.

4.3.2 Extrato Aquoso a 20%

O extrato aquoso a 20 % foi preparado por maceração de 40 g de material vegetal seco e estabilizado com 200 mL de água destilada em banho-maria a 60 °C. O extrato foi filtrado em papel de filtro e com ele foram realizadas as análises de características organolépticas, cor e pH.

4.3.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos

Foram colocadas em três tubos de ensaio porções de 5 mL do extrato aquoso. Ao primeiro foi acidificado ácido sulfúrico N até pH 1; o segundo foi alcalinizado com hidróxido de sódio até pH 10 e o terceiro neutralizado até pH 7. O aparecimento de diferentes colorações indicam a presença de heterosídeos antociânicos.

A presença de leucoantocianidinas (amarelas) pode ser verificada pela seguinte reação de formação de antocianidinas (vermelhas): transferir para funil de separação 10 mL do extrato aquoso e extrair com 2 vezes de 10 mL de butanol

saturado com água. Reunir as frações de butanol em cápsula de porcelana e concentrar a 5 mL. Adicionar cinco gotas de ácido clorídrico concentrado e aquecer à ebulição.

4.3.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos

Os três tubos de ensaio utilizados na análise de heterosídeos antociânicos foram agitados energicamente por cinco minutos e foram deixados em repouso por 30 minutos. A espuma formada foi medida, em centímetros. Espuma persistente, maior ou igual a um centímetro indica a presença de heterosídeos saponínicos.

4.3.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos

a) Reação de Isopurpurato de sódio

Em tubo de ensaio foram colocados 15 mL do extrato aquoso e foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico N sem umedecer as paredes do tubo. Uma tira de papel picro-sódico foi suspenso com o auxílio de rolha de cortiça na boca do tubo; a tira não deve tocar o extrato. O tubo de ensaio foi colocado em banho-maria a 60 °C, durante 30 minutos. Coloração vermelha no papel indica presença de heterosídeos cianogenéticos.

b) Reação de Schoembein

Em cápsula de porcelana, colocar 5 mL do extrato aquoso mais quatro gotas de hidróxido de sódio ou de potássio a 10 %, três cristais de sulfato ferroso e uma gota de cloreto férrico. Aquecer até a ebulição e adicionar uma gota de ácido clorídrico concentrado. O desenvolvimento de coloração azul da Prússia indica

presença de heterosídeo cianogenético.

4.3.2.4 Pesquisa de taninos

a) Reação com cloreto férrico 1 % (m/v): A 5 mL do extrato aquoso foram adicionadas cinco gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração verde a azul, cinza, marrom ou formação de precipitado indicam a presença de taninos.

b) Reação com sulfato de ferro amoniacal 1 % (m/v): A 5 mL do extrato aquoso foram adicionadas duas gotas de solução aquosa de sulfato de ferro amoniacal a 1 %. O desenvolvimento de coloração de verde a azul indica a presença de taninos.

c) Reação com acetato de chumbo 10 % (m/v): A 5 mL do extrato aquoso foram adicionados 5 mL de ácido acético a 10 % e 5 mL de solução aquosa de acetato de chumbo a 10 %, gota a gota. A formação de precipitado indica a presença de taninos.

d) Precipitação com solução de gelatina a 2,5 % em cloreto de sódio a 0,9%: O extrato foi transferido para tubos de ensaio em frações de 0,5 mL, 1 mL e 2 mL. A cada tubo foram adicionados 2 mL da solução de gelatina a 2,5 %. A formação de precipitado nesta fase indica a presença de taninos.

e) Reação com formol-clorídrico: Em balão de fundo chato de 100 mL de capacidade foram colocados 30 mL do extrato aquoso, 6,0 mL de formaldeído e 4,0 mL de ácido clorídrico concentrado. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levado ao refluxo por uma hora e o conteúdo foi filtrado a quente. O resíduo do papel de filtro foi lavado com álcool etílico a 70 % e foi gotejada solução aquosa

de hidróxido de sódio a 5 %. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e três gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.3.2.5 Pesquisa de Aminogrupos

Em um béquer 10 mL do extrato aquoso foram concentrados a 5 mL em banho-maria a 60 °C. Cinco gotas do extrato concentrado foram depositadas em papel de filtro, em pontos previamente determinados. Depois de secas, o reativo de ninhidrina foi nebulizado sobre o papel de filtro, que foi levado para a estufa à temperatura de 100 °C por 15 minutos. O desenvolvimento de coloração azul-violácea indica a presença de aminogrupos.

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS:

As amostras de planta seca, estabilizada e moída foram pesadas e extraídas em aparelho de Soxhlet modificado segundo CARVALHO, 2001 (figura 10).

FIGURA 10 – APARELHO DE SOXHLET MODIFICADO PARA PREPARAÇÃO DE EXTRATOS



FONTE: DIAS, 2004.

O aparelho foi conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato de capacidade para 3 L com pérolas de vidro. A este sistema foi adicionado álcool etílico 96 °GL até que metade do balão fosse preenchida de líquido (aproximadamente 1500 mL). Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por seis horas, de modo que o extrato alcoólico foi obtido por extração a frio em meio solvatado (CARVALHO, 2001, p.24).

Para a utilização deste equipamento, procedeu-se da seguinte forma: a placa porosa foi cuidadosamente posicionada sobre os suportes de vidro do aparelho e sobre ela foi colocado algodão. Sobre o algodão foi adicionado o material vegetal e 1000 mL de etanol 96 °GL para maceração. O líquido extrator contido no

balão aquecia e evaporava, e condensava a 60 °C no condensador de bolas. Desta forma, o líquido, já condensado, passava por uma “coluna” de vegetal, permitindo que a extração fosse realizada até que o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atingisse o ponto de refluxo; desta forma, o extrato era levado ao balão e o processo se repetiu por seis horas.

Este procedimento deve prevenir a degradação térmica de substâncias no balão, uma vez que a quantidade de líquido extrator é constante no sistema e é capaz de solvatar os compostos presentes.

As porções foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo até 300 mL. A partir deste momento, este extrato é chamado EXTRATO BRUTO.

O extrato bruto foi usado para a obtenção das frações por partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: n-hexano, diclorometano e acetato de etila. Todos os solventes usados foram de padrões analíticos (PA).

O quadro 2 traz as legendas para todos os extratos e frações obtidos neste estudo.

QUADRO 2 – IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Cereus jamacaru*

ORIGEM	PARTE	IDENTIFICAÇÃO
COMERCIAL	Parte aérea sem espinhos	EB 2
EMBRAPA	Córtex das partes aéreas	EBCO
EMBRAPA	Lenho das partes aéreas	EBLE

4.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES:

A partição líquido-líquido deu-se em ordem crescente de polaridade (do solvente menos polar para o mais polar) utilizando aparelho de Soxhlet modificado, segundo CARVALHO, 2001 (figura 11). O aparelho foi conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato de capacidade para 150 mL, com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em chapa aquecedora e deixado

em refluxo contínuo por seis horas.

FIGURA 11 –APARELHO DE SOXHLET ADAPTADO PARA A PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO



FONTE: DAVET, 2004

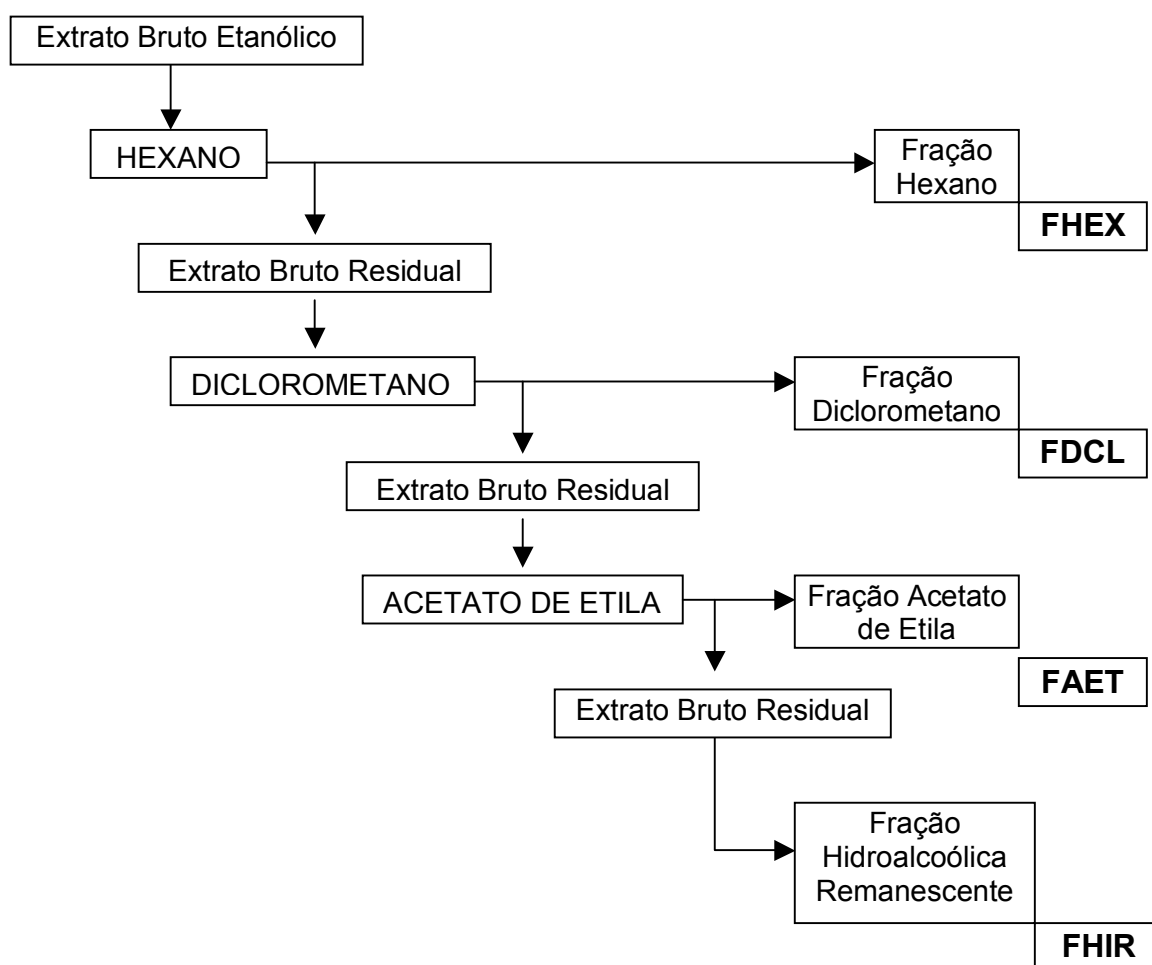
Para a extração com solventes mais densos que o Extrato Bruto foi necessário utilizar cartucho de vidro (tipo tubo de centrifuga) e funil adaptado até a base do cartucho em aparelho de Soxhlet convencional. Neste caso, o solvente que estava no balão era aquecido e evaporado e, após condensar, gotejava dentro do funil, passando por dentro do cartucho. Assim, o extrato foi particionado de baixo para cima, promovendo o arraste de substâncias por afinidade. Na parte superior do cartucho havia dois furos, que permitiam a saída do solvente (depois da extração), que ocupava o espaço entre o cartucho e as paredes do Soxhlet. Quando o menisco alcançava o ponto de refluxo do canal lateral do aparelho, o solvente com as substâncias extraídas foram despejados sobre o conteúdo do balão. Uma vez que o solvente evapora puro (ou seja, sem substâncias extraídas do E.B.), o processo se repete como se fosse uma extração nova; o aquecimento foi mantido por seis horas.

Em casos de solventes mais densos, o aparelho de Soxhlet foi modificado de

modo a impedir o refluxo do solvente para o balão. A dilatação do canal lateral do Soxhlet foi retirada e o canal foi alargado na porção superior. Desta forma, quando o menisco atinge a curva do canal, não há refluxo, mas gotejamento constante. Nas duas situações, a partição se dá lentamente, com o máximo de contato possível.

Todas as frações foram levadas à secar em evaporador rotativo a 40 °C e 600 mmHg e os resíduos foram solubilizados em 100 mL de metanol. O metanol foi utilizado para a solubilização por ter grande capacidade de solvatação e ainda por permitir a precipitação de diversas substâncias. Foi realizado o resíduo seco para cada fração. O fluxograma representado na figura 12 mostra esquematicamente como foram obtidas as frações.

FIGURA 12 – FLUXOGRAMA GERAL DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES A PARTIR DO E.B.



4.6 OBTENÇÃO DO RESÍDUO SECO

Os resíduos secos das frações e do extrato bruto foram obtidos da seguinte forma: 10 mL de cada fração e do extrato bruto foram pipetados em pipeta volumétrica e transferidos para placas de Petri previamente taradas. A placa foi deixada em estufa a 105 °C até peso constante (aproximadamente 1,5 h). A diferença de massa entre a placa cheia e vazia fornece a quantidade de resíduo em 10 mL de fração.

4.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD):

As análises de CCD foram realizadas pela otimização de metodologias descritas em STAHL (1969, p. 904), LOGGIA (1993, p. 354) e MABRY (1970, p. 4-14). Todas as placas utilizadas eram de sílica gel Merck.

4.7.1 CCD para Visualização de Alcalóides

A fase móvel foi desenvolvida com base no padrão de tiramina e L-tirosina. Uma vez que a fase tradicional (clorofórmio: acetona: dietanolamina (50:40:3) revelando-se com Reativo de Dragendorff) não apresentou bons resultados para a separação destas substâncias, foi desenvolvida fase móvel diclorometano:acetato de etila:ácido fórmico (4:1:1), com revelador Ninhidrina. Este revelador é geralmente utilizado para aminoácidos pois revela grupos amina.

Este conjunto fase móvel/revelador foi utilizado para a pesquisa e/ou confirmação de alcalóides feniletilamínicos durante todo o processo, com os extratos brutos, frações e substâncias isoladas.

4.7.2 CCD para Visualização de Flavonóides

A fase móvel utilizada foi acetato de etila: acetona: água (15:8:5) e o revelador foi o Reativo de NEU (2-aminoetilbutirato). Os flavonóides, em geral, apresentam coloração amarela a alaranjada e aparecem como mancha escura sob radiação ultravioleta em 254 nm e 366 nm.

Este conjunto fase móvel/revelador foi utilizado para a pesquisa e/ou confirmação de flavonóides durante todo o processo, com os extratos brutos, frações e substâncias isoladas.

4.7.3 CCD para Visualização de Esteróides

Para esteróides foi utilizada a fase móvel tolueno: acetato de etila (93:7) e o revelador foi Solução de Vanilina Fosfórica e subsequente aquecimento a 110 °C. As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta em 254 nm e 366 nm.

Este conjunto fase móvel/revelador foi utilizado para a pesquisa e/ou confirmação de esteróides durante todo o processo, com os extratos brutos, frações e substâncias isoladas.

4.8 EXTRATO BRUTO DA AMOSTRA COMERCIAL (EB 2):

O extrato bruto da amostra comercial foi obtido conforme descrito no item 4.4, com o objetivo de compará-lo em composição e atividade aos extratos das partes isoladas, fornecidos pela EMBRAPA.

Durante o processo de redução de volume, houve precipitação de cristais na forma de agulhas brancas, totalizando 2,45 g. Este precipitado foi denominado EB2ppt01 e foi submetido à análise por espectrofotometria de infravermelho.

O EB2 teve rendimento de 500 mL a partir de 1535,7 g de material vegetal. Após concentração em evaporador rotatório, foi levado à geladeira (5 °C) por 24 h e filtrado a vácuo.

4.8.1 Fracionamento de EB 2

O extrato bruto da amostra comercial (100 mL) foi fracionado seguindo-se o descrito no item 4.5. A fração hidroalcoólica remanescente, rica em alcalóides, foi encaminhada para análise por CLAE. As frações diclorometano e acetato de etila não foram alvo deste estudo. Os resíduos secos de cada fração foram obtidos conforme item 4.6.

4.9 EXTRATO BRUTO DA AMOSTRA EMBRAPA – LENHO (EBLE):

O extrato bruto do lenho de *Cereus jamacaru* foi obtido conforme descrito no item 4.4, com rendimento de 175 mL a partir de 900 g de material vegetal. Durante a redução de volume houve precipitação de cristais branco-amarelados, em forma de agulhas. Este precipitado foi lavado exaustivamente com metanol gelado e levado à geladeira para separação dos cristais brancos do óleo amarelo. Os cristais foram separados totalizando 6,5 g. Este precipitado foi denominado **LEppt01**. Os cristais foram levados à análise por espectrofotômetro de infravermelho.

O EBLE foi então deixado em repouso a 5 °C e filtrado a vácuo.

4.9.1 Fracionamento do EBLE:

O extrato bruto do lenho (120 mL) foi fracionado seguindo-se o descrito no item 4.5. A fração hexano foi encaminhada para análise por CG-EM e a fração hidroalcoólica remanescente, rica em alcalóides, foi encaminhada para análise por CLAE. As frações diclorometano e acetato de etila não foram alvo deste estudo. Os resíduos secos de cada fração foram obtidos conforme item 4.6.

4.9.1.1 Fração Hexano

Após solubilização da fração hexânica em metanol, houve precipitação de pó branco. Para retirar o precipitado toda a fração foi levada à secura e dissolvida em 50 mL de acetona. O conteúdo foi decantado (A) e o sobrenadante foi retirado e levado à secura (B). O conteúdo decantado (A) foi novamente lavado com acetona e o resíduo (B) foi redissolvido em metanol. O resíduo (B) lavado foi decantado e separado; foram obtidos 10,5 mg de precipitado claro, denominado **LE-HEX01**. O sobrenadante foi levado à secura e lavado com clorofórmio, dando origem a 6,5 mg um precipitado branco, denominado **LE-HEX03**.

O conteúdo decantado (A), lavado duas vezes com acetona resultou em 8,7 mg de precipitado na forma de agulhas brancas, denominado **LE-HEX02**.

Os precipitados LE-HEX01 e LE-HEX02 foram enviados para análise por ^{13}C RMN; LE-HEX03 foi enviado para análise por CG.

4.10 EXTRATO BRUTO AMOSTRA EMBRAPA – CÓRTEX (EBCO):

O extrato bruto do córtex de *Cereus jamacaru* foi obtido conforme descrito no item 4.4, com rendimento de 215 mL a partir de 906,85 g de material vegetal. Durante a redução de volume houve precipitação de cristais branco-amarelados, em forma de agulhas. Este precipitado foi lavado exaustivamente com metanol gelado e levado à geladeira para separação dos cristais brancos do óleo amarelo. Os cristais

foram separados totalizando 2,9 g. Este precipitado foi denominado **COppt01**, que foi analisado por espectrofotometria de infravermelho.

O EBLE foi então deixado em repouso a 5 °C e filtrado a vácuo.

4.10.1 Fracionamento do EBCO:

O extrato bruto do córtex (100 mL) foi fracionado seguindo-se o descrito no item 4.5. A fração hexano foi encaminhada para análise por CG-EM e a fração hidroalcoólica remanescente, rica em alcalóides, foi encaminhada para análise por CLAE. As frações diclorometano e acetato de etila não foram alvo deste estudo. Os resíduos secos de cada fração foram obtidos conforme item 4.6.

4.10.1.1 Fração Hexano

Cerca de 1 mL da fração foi levado para análise por cromatografia gasosa para comparação com o obtido a partir do lenho. A técnica utilizada foi a descrita por CARVALHO, 2001.

4.11 METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE ESTERÓIDES POR CG

Para esta análise, foi utilizado cromatógrafo gasoso com colunas megabore DB-1 (100% dimetilpolisiloxano, polaridade 5) e DB-17 (50% fenil e 50% dimetilpolisiloxano, polaridade 24) de 0,53 mm de diâmetro interno por 30 m de comprimento. O gás de arraste foi o hidrogênio a 6 mL por minuto, *split* a 6 mL por minuto (razão 1:1), a purga do septo foi realizada a 3 mL por minuto, *make up* de nitrogênio a 25 mL por minuto e oxigênio a 100 mL por minuto. Para esta análise foi utilizado gradiente de temperatura, onde a temperatura inicial foi 100 °C, sustentada por 1 minuto; a rampa de aquecimento foi de 7 °C por minuto até 260 °C, sustentados por 66 minutos. O volume de injeção foi de 2 µL.

Como padrão interno foi utilizado o acetato de tocoferol, cujo tempo de retenção foi utilizado para estimar os tempos de retenção relativa das substâncias apresentadas pela amostra. A retenção relativa é calculada de acordo com a fórmula que segue:

$$RR = t_a/t_p \quad (1)$$

Onde,

RR = retenção relativa

Ta = tempo de retenção do composto (minutos)

Tp = o tempo de retenção do padrão (minutos)

Neste caso o tempo Tp corresponde ao tempo de retenção do acetato de tocoferol.

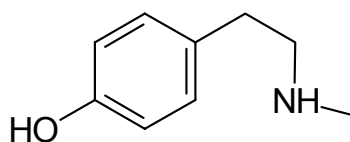
4.12 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE EM CLAE

A metodologia de análise foi inicialmente desenvolvida utilizando-se dois padrões de aminas presentes em Cactáceas: tiramina e hordenina, e o aminoácido precursor, tirosina. Após o estabelecimento da técnica com os padrões, as amostras foram testadas por co-injeção (adição).

Durante o desenvolvimento do método de análise por CLAE foram utilizados os sistemas de fase móvel em gradiente e isocrático. O sistema de gradiente não permitiu a reprodutibilidade da análise, prejudicando o andamento do desenvolvimento do método.

Primeiramente, a análise teve como objetivo identificar e quantificar a amina aromática tiramina e seu precursor tirosina, e verificar a presença de hordenina. Entretanto, após o estabelecimento da técnica para os padrões, foram analisadas algumas amostras e foi observado um pico, cujo tempo de retenção foi intermediário

aos padrões de tiramina e hordenina. Uma vez que estas substâncias diferem entre si em dois grupamentos metila ligados ao nitrogênio amínico, seria plausível admitir que este pico corresponderia a uma substância com a estrutura da tiramina e apenas um grupamento metila ligado ao nitrogênio, a N-metiltiramina (13). Considerando que a análise por CLAE separa substâncias de uma série homóloga de acordo com sua afinidade pela coluna, e que esta afinidade está relacionada à polaridade do composto, esta substância teria polaridade intermediária às dos padrões.



(13)

Devido à dificuldade de encontrar o padrão de N-metiltiramina no mercado, foi necessária a síntese, conforme item 5.1.

Os itens seguintes são o detalhamento do raciocínio já descrito.

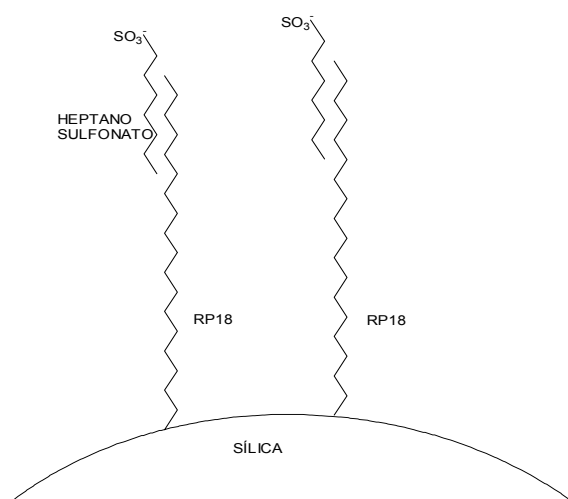
4.12.1 Desenvolvimento de metodologia isocrática para análise dos padrões da série homóloga tirosina, tiramina e hordenina

Em geral, os métodos para análise de aminas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa utilizam solução tampão na fase aquosa (PELLATI *et al.*, 2002, p. 1114-1119). As soluções tampão podem prejudicar o equipamento, pois os cristais dos sais utilizados em sua composição podem se concentrar e incrustar nos pistões da bomba, além de exigirem alto tempo de estabilização da coluna cromatográfica (WATERS; 2003; p. 11.5). Assim, este método propõe alternativa inclusive para outros métodos que possam eventualmente diminuir a vida útil do sistema analítico.

Segundo COMELLAS e TOMÁS, (2002, p. DS15) as caudas dos picos em CLAE e o tempo de estabilização da coluna podem ser reduzidos pela transformação da análise em fase reversa para cromatografia de par iônico. Isto pode ser obtido pela otimização do eluente (fase móvel), em cuja composição é adicionado composto capaz de interagir com as cadeias carbônicas da fase estacionária e uma extremidade polar ionizável, que fará o pareamento iônico com a amostra.

Segundo este raciocínio, a cadeia carbônica é atraída por forças de Van der Waals pelos carbonos ligados à sílica na coluna RP 18 (figura 13); os ácidos alquil-sulfônicos são indicados como contra-íons para a análise de aminas aromáticas (COMELLAS e TOMÁS, 2002, p. DS 16).

FIGURA 13 – INTERAÇÕES DE VAN DER WAALS ENTRE LAURIL-SULFATO DE SÓDIO E COLUNA RP-18



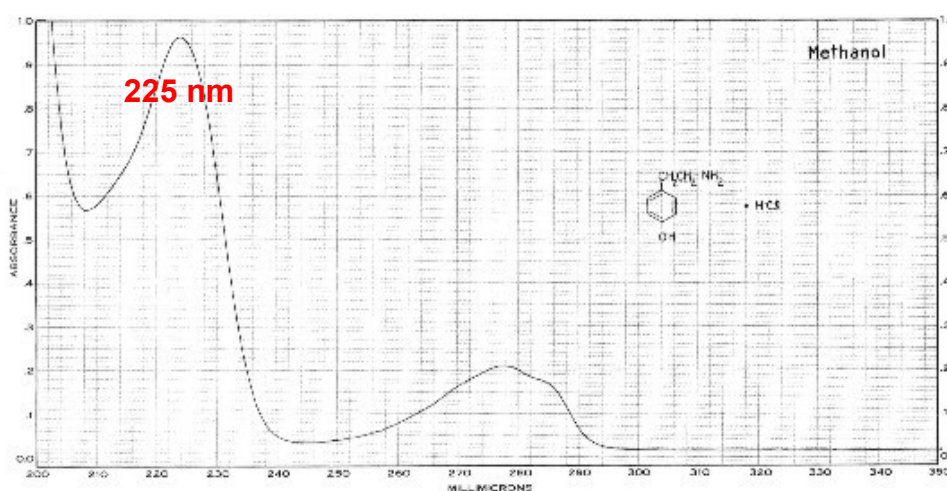
FONTE: WATERS; 2003; p. 7-7

Assim, quanto maior a cadeia carbônica do sistema de pareamento iônico (hexano, heptano, octano...), melhor a eficiência da análise; o aumento no poder de solvatação da coluna aumenta o número de pratos teóricos, melhorando a separação (WATERS; 2003; p.7-10).

Para o desenvolvimento desta metodologia foi utilizado lauril-sulfato de sódio, cuja cadeia alifática possui doze carbonos, em substituição ao heptano sulfonato de sódio.

O comprimento de onda utilizado para a análise foi de 225 nm, correspondente ao ponto de maior absorção no ultra-violeta para a tiramina, conforme figura 14.

FIGURA 14 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA TIRAMINA NO UV



FONTE: STADLER, 1967 (espectro 2997 UV)

O método isocrático para análise dos padrões de aminas tiramina e hordenina e do aminoácido tirosina foi: Fase estacionária: Coluna RP 18 de 125 mm; looping de 20 µL; Fase Móvel: 0,5 mg/mL de lauril-sulfato de sódio, 0,02 N de ácido sulfúrico, 0,4 % ácido fosfórico 85 % e 20 % de acetonitrila; fluxo 1,50 mL/min; comprimento de onda: 225 nm; Temperatura do forno: 35 °C.

Este método foi utilizado para as análises descritas no item 5.4.1.a e 5.4.1.b e 5.4.2.

4.12.2 Preparo da fase móvel com acetonitrila

Em um balão volumétrico de 500 mL foram adicionados 250 mg de lauril sulfato de sódio e 100 mL de ácido sulfúrico 0,1 N. O conteúdo foi levado à agitação para completa dissolução. Em seguida foram adicionados 200 mL de água e 100 mL de acetonitrila e 2 mL de ácido fosfórico 85 %. O volume foi completado com água.

4.12.3 Preparo da solução de padrões de referência tirosina, tiramina e hordenina

Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 100 µL de cada solução de 1 mg/mL dos padrões comerciais de tirosina e tiramina e 100 µL da solução de hordenina 2 mg/mL e 500 µL da fase móvel (item 4.12.2).

4.12.4 Análise de amostras de *Cereus jamacaru* por CLAE

Após estas análises, foram testados os extratos brutos comercial (EB 2), de córtex (EB CO) e de lenho (EB LE) e suas respectivas frações hidroalcoólicas (EB2-FHIR, EBCO-FHIR e EBLE-FHIR).

Além disso, as frações hidroalcoólicas remanescentes foram testadas puras e após extração ácido-base. Para tanto, cada fração foi levada à secar a 60 °C em banho-maria e solubilizada em ácido clorídrico 25 %. A extração foi feita com diclorometano em aparelho de Soxhlet modificado. Após aproximadamente seis horas de refluxo contínuo, o material do balão foi retirado, dando origem à fração ácida. O resíduo da amostra foi basificado com hidróxido de amônio concentrado até pH 10; após seis horas de refluxo com diclorometano foi obtida a fração básica. Este processo está baseado na propriedade básica do alcalóide, que forma um sal em pH ácido e torna o composto solúvel em água. Em pH básico, os alcalóides são bases livres e são solúveis em solventes orgânicos (HENRIQUES, KERBER e MORENO *in* SIMÕES, 2001, p.662).

Foram utilizados, separadamente, 20 mL de EBLE-FHIR, 10 mL de EBCO-FHIR, 10 mL de EB2-FHIR.

Com o objetivo de verificar a eficiência da extração ácido-base, uma das amostras (EB2-FHIR) foi submetida à hidrólise ácida. Para tanto, foram utilizados 10 mL da fração e 10 mL de ácido clorídrico N em balão de fundo chato conectado a um condensador de bolas. O conteúdo foi deixado em refluxo por 4 horas. Após o término do tempo, o material do balão foi submetido a extração com solvente orgânico (clorofórmio) em meio básico (hidróxido de amônio até pH 10), realizada em funil de separação. Foram reunidas 3 frações de 10 mL de fase orgânica, levadas à secar em banho-maria a 60 °C e solubilizadas em 5 mL de metanol. Este material foi levado à análise por CLAE.

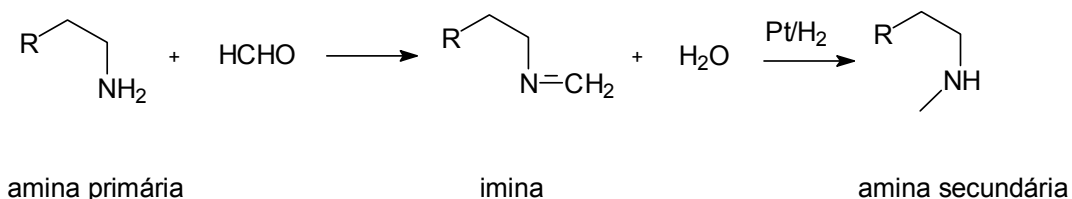
Os resultados indicaram a presença de um pico intermediário aos padrões de tiramina e hordenina, fato que levou à síntese da N-metiltiramina.

O melhor processo de extração foi sugerido como processo para controle de qualidade da planta. Para este caso, o resultado da análise foi dado em miligramas de substâncias por cem gramas de vegetal.

4.12.5 Síntese de N-metiltiramina

Segundo SALVATORE, YOON e JUNG (2001, p. 7785-7811) aminas secundárias podem ser sintetizadas a partir de uma amina primária via precursor imina seguida de hidrogenação, conforme reação geral na figura 15.

FIGURA 15 – ESQUEMA GERAL DA SÍNTESE DE AMINAS SECUNDÁRIAS



FONTE: SALVATORE, YOON, JUNG; 2001; p.7786.

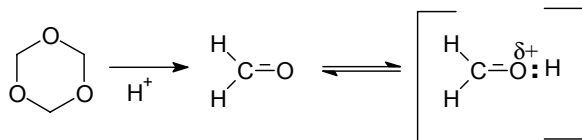
Neste método, a formação da imina protege o nitrogênio de outras metilações. Nesta reação, o formaldeído reage rapidamente com a amina primária, e o excesso deste reagente pode levar à dupla metilação. Desta forma, a proporção dos reagentes é o método para controle da formação da amina metilada e da não formação da dimetilada. BHATTACHARYYA (1995, p. 2062-2063) sugeriu a utilização de cloreto de zinco e borohidreto de sódio para a metilação de aminas primárias, via formação de imina. Em seu estudo, Bhattacharyya afirma não ser possível controlar a reação, indicando que somente há a formação de dimetilaminas. É importante ressaltar, no entanto, que a proporção de formaldeído na reação foi quatro vezes maior que a de amina, indicando a dimetilação.

Para a síntese da N-metiltiramina foram utilizados 50 mg de tiramina e 10,9 mg de paraformaldeído (mistura equimolar) em 5 mL de etanol; a mistura foi mantida em refluxo por duas horas para a formação da imina; em seguida, foi encaminhada para hidrogenação por 12 horas a 3 atm. Para a hidrogenação, foram adicionados 1,2 mL de ácido acético glacial e 0,06 mg de catalisador (platina em carbono). A reação foi confirmada por CCD e o material foi enviado para uso como substância de referência para CLAE, segundo a técnica proposta no item 5.

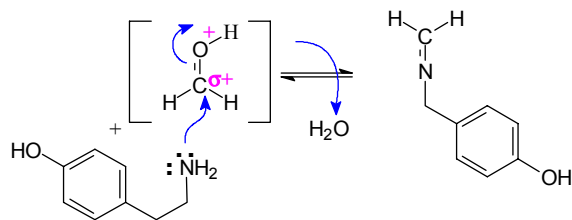
Segundo o esquema geral de síntese de aminas secundárias, é possível que a reação tenha seguido o mecanismo apresentado na figura 16.

FIGURA 16 – REAÇÃO PARA A FORMAÇÃO DE N-METILTIRAMINA A PARTIR DE TIRAMINA E PARAFORMALDEÍDO

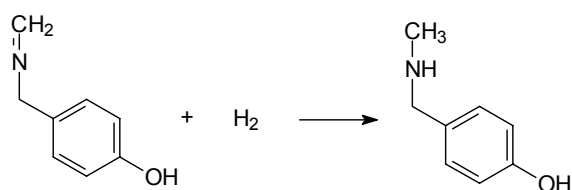
Primeira etapa: Hidrólise do paraformaldeído



Segunda etapa: Formação da imina



Terceira etapa: Hidrogenação da imina para formação da metilamina



4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *Cereus jamacaru* foram utilizados dois métodos: difusão em ágar e concentração inibitória mínima (MIC). A substância pura tiramina também foi testada, tendo sido utilizado apenas o método de MIC.

Os extratos brutos testados foram EB2, EBLE e EBCO, todos em duplicata.

As cepas utilizadas foram as apresentadas no quadro 3.

QUADRO 3 – CEPAS UTILIZADAS PARA A AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

MICROORGANISMO	ATCC
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615
<i>Streptococcus epidermidis</i>	12228
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<i>Proteus mirabilis</i>	43071
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27283
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883
<i>Escherichia coli</i>	11229
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028

4.13.1 Difusão em ágar

A avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar seguiu a metodologia apresentada por ROMEIRO, 2001. Neste método, avalia-se o resultado pela formação de halo de inibição ao redor de disco impregnado com extrato colocado em placa com meio sólido em que é inoculada solução padronizada de microorganismo. O resultado positivo é dado em milímetros, correspondendo ao diâmetro do halo de inibição.

O extrato bruto EBCO e EBLE foi impregnado em discos estéreis de papel (6 mm de diâmetro) nas concentrações 100 %, 50 %, 25 % e 12,5 %; as diluições foram feitas em etanol. Para cada disco foram usados 10 µL de solução. A tabela 4 traz as correlações entre as diluições e as concentrações de sólidos.

Os discos foram levados a 40 °C e, depois de secos, foram espalhados em Placa de Petri adquiridas comercialmente, com meio Ágar Mueller-Hinton. Como padrões foram utilizados os antibióticos comerciais cloranfenicol 30 µg. Os padrões eram marca Newprov, onde o cloranfenicol código CLO30 - Lote A6389 validade Jan/05 e cefalotina código CFL30 -Lote 996 validade Out/05.

Em cada placa foram colocados um disco de cada diluição, um apenas com etanol (controle) e um com o padrão de cloranfenicol, totalizando seis discos por

placa. Também foram preparadas placas-controle com os padrões e o controle (etanol) com etanol para cada microorganismo.

As placas foram incubadas em estufa a 35 °C e os resultados foram lidos após 24 horas.

4.13.2 Concentração inibitória mínima (MIC)

O teste da concentração inibitória mínima seguiu metodologia adaptada de KONEMAN, 1993. Segundo este método o extrato é adicionado a meio líquido em várias concentrações. Os microorganismos são inoculados nos tubos de ensaio e incubados por 24 horas a 35 °C. O resultado é lido comparando-se o controle negativo com cada tubo; o último tubo em que há inibição de crescimento do microorganismo é considerado o MIC.

Para este estudo foram utilizados os extratos brutos EBLE e EBCO; as diluições de bactérias foram feitas em Tween 80 a 20 % na concentração do tubo 0,5 da escala de McFarland em caldo caseína de soja – CASOY. As concentrações de extrato/inóculo foram 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64.

Como controle positivo foi preparado tubo com 2,5 mL de suspensão de bactérias e 1,0 mL de caldo nutritivo; o controle negativo foi o extrato diluído em caldo nutritivo na concentração 1:1, sem o inóculo de microorganismos. O controle negativo é o padrão sem crescimento para eliminar a turbidez da amostra como fator de confundimento e o controle positivo certifica o crescimento do microorganismo nas condições do ensaio, sem o extrato.

No caso da tiramina, foi preparada solução matriz de 1,0 mg/mL e água estéril, de onde foram feitas as diluições. O ensaio foi realizado da mesma maneira utilizada para os extratos, e as concentrações de tiramina/inóculo foram 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64, correspondendo a 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 µg/mL de tiramina, respectivamente. Estas concentrações foram escolhidas com

base em concentrações de substâncias puras, como os padrões de cloranfenicol e cefalotina, por exemplo.

4.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Para avaliação da atividade alelopática foi utilizado o método descrito em PEITZ, 2003.

Os extratos brutos EBLE e EBCO foram avaliados quanto à capacidade de inibir ou inviabilizar o crescimento de sementes de *Lactuca sativa* (alface).

Foram testadas sete concentrações diferentes (decrecentes) para cada extrato. As amostras foram preparadas de modo que 0,6; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025 mg de extrato fossem diluídos para 2 mL com metanol. Todas as amostras foram testadas em quadruplicata.

Estas soluções foram utilizadas para embeber pedaços de papel de filtro, de modo que, após a evaporação do metanol, todo o conteúdo de sólidos estivesse distribuído no suporte de papel; cada pedaço de papel foi devidamente posicionado em caixas Gerbox. As caixas foram separadas em dois grupos e incubadas a 60 °C por 24 horas para evaporação total do solvente.

Em cada caixa foram adicionadas sementes de alface (cultivar Babá com 99% de germinação), cuidadosamente posicionadas. Todas as caixas foram incubadas em temperatura de 17 a 20 °C em Germinador, enroladas em papel alumínio (este cultivar não precisa de fotoperíodo, devendo ser incubado no escuro). O primeiro grupo foi utilizado para a leitura de germinação e o segundo para a leitura de crescimento.

Para os dois testes foi realizada a comparação com o branco, preparado com água. As leituras foram realizadas em fluxo laminar para evitar a exposição das sementes aos microorganismos do ar; as sementes eventualmente contaminadas por fungos são eliminadas e não são consideradas no resultado.

- Germinação:

Para o estudo da germinação fez-se leitura diária, necessariamente no mesmo horário, abrindo-se as caixas e verificando-se as sementes que germinaram. Estas sementes foram contadas e retiradas das caixas. Esta leitura foi realizada por seis dias.

- Crescimento:

As caixas preparadas para a leitura da influência do extrato sobre o crescimento foram mantidas no germinador por sete dias consecutivos. As caixas foram abertas e as sementes foram retiradas uma a uma para medir a radícula (que origina a raiz) e o hipocótilo (que origina o caule) em papel milimetrado. O resultado é calculado em milímetros. Também foi considerada a presença/ausência de folíolo (que origina as folhas). Os resultados foram submetidos à análise estatística, segundo o Teste de Scott-Knott (FERREIRA, 2000).

Este mesmo teste foi feito para a tiramina, cuja presença já havia sido identificada em estudos anteriores (BRHUN e LINDGREN, 1976) e confirmada por CCD, CG-MS e CLAE. Foram preparadas soluções de 0,6 - 0,4 - 0,3 - 0,2 - 0,1 - 0,05 - 0,025 mg de tiramina Sigma®.

4.15 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Para as análises de IV, foi utilizado equipamento de infravermelho BIORAD® FTS 3500 GX do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná; a análise foi realizada de 400 a 4000 cm^{-1} com transformada de Fourier (IVTF) e o material foi preparado em pastilha de KBr a 1 %.

A ressonância nuclear magnética de ^{13}C foi realizada em equipamento AC 200 Bruker® a 50 Hertz do Departamento de Química da UFPR; como solvente foi utilizado o clorofórmio deuterado (CDCl_3). O padrão de referência interna foi o tetrametil-silano (TMS).

Nas análises por CG foi utilizado cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo 14 B; coluna megabore DB-1 (100% dimetilpolisiloxano, polaridade 5) e DB-17 (50% fenil e 50% dimetilpolisiloxano, polaridade 24) com 0,53 mm de diâmetro interno por 30 m de comprimento. Utilizou-se como gás de arraste hidrogênio.

O método de CLAE foi desenvolvido em equipamento Merck® La-Chrom, com detector de UV, injeção manual e sistema de solventes em gradiente, interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows NT.

O fluxo laminar para os teste de microbiologia e manipulação de amostras para alelopatia foi LabCon Co. Purifier Class II Total Exhaust. Na alelopatia foi utilizado o Germinador Mangeldorf Biomatic® a 20 °C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO SISTEMÁTICO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA:

A tabela 1 apresenta os resultados de pH, odor e resíduo seco das frações dos extratos preparados a partir de amostra comercial para uso na análise sistemática preliminar.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E AQUOSO A 20 % E DAS FRAÇÕES DA AMOSTRA COMERCIAL

CARACTERÍSTICA	EXTR. ALC.				EXTR. AQ
	FHEX	FAET	FCLOR	FHIR	
pH	5,35	4,5	5,0	6,10	5,0
Resíduo seco	0,2 g%	0,375 g%	0,4 g%	3,65 g%	6,85 g%
Cor	verde-limão	amarelo-ouro	amarelo-claro	marrom-escuro	marrom

LEGENDA: HEX, AET, CLOR e HIR são respectivamente as frações Hexano, Acetato de Etila, Clorofórmio e Hidroalcoólica Remanescente do Extrato Hidroalcoólico a 20 % (EXTR. ALC). O extrato aquoso está representado por EXTR. AQ.

As tabelas 2 e 3 apresentam os resultados da análise sistemática qualitativa preliminar para a identificação de grupos de metabólitos secundários presentes em cada fração.

TABELA 2 – RESULTADOS DO ENSAIO SISTEMÁTICO EM FITOQUÍMICA COM EXTRATO AQUOSO A 20% DA AMOSTRA COMERCIAL

ENSAIO	Extrato
Heterosídeos Antociânicos	-
Saponinas	+
Heterosídeos Cianogenéticos	-
Taninos	
Cloreto Férrico	-
Sulfato de Ferro	+
Acetato de Chumbo	+
Gelatina	-
Formol-clorídrico	+ (condensados)
Aminogrupos	+

LEGENDA: (+) Positivo; (-) Negativo

TABELA 3 – RESULTADOS DO ENSAIO SISTEMÁTICO EM FITOQUÍMICA COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20 % DA AMOSTRA COMERCIAL E DE SUAS FRAÇÕES

ENSAIO	FRAÇÃO			
	FHEX	FCLOR	FAET	FHIR
Alcalóides				
Dragendorff	-	-	-	+
Mayer	-	-	-	+
Bertrand	-	-	-	+
Bouchardat	-	-	-	+
Falvonóides				
Leucoantocianidinas	-	-	-	-
Heterosídeos flavônicos	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	+	+
Esteróides e Triterpenos	+	+	+	-
Kedde	-	-	-	-
Baljet	+	-	-	-
Tollens	+	+	+	-
Keller-Kelliani	+	+	-	-

LEGENDA DOS RESULTADOS: FHEX = Fração Hexano; FCLOR = Fração Clorofórmio; FAET = Fração Acetato de Etila; FHIR = Fração hidroalcoólica remanescente; (+) Positivo; (-) Negativo

Conforme pode ser observado nos resultados da análise preliminar, as hastes de *Cereus jamacaru* são ricas em alcalóides e esteróides, confirmando o indicado pela literatura para as Cactáceas. Os alcalóides estão especialmente concentrados na fração hidroalcoólica remanescente sugerindo que estejam na forma de sal. Isto acontece porque os alcalóides são bases (contém um nitrogênio) e são solúveis em água na forma de sal.

Outra sugestão é a de que os alcalóides estejam ligados a açúcares, como já foi observado em LIN *et al.* (1987, p 422-426; 1991, p. 188-191) quando foram identificados glicosídeos derivados de hordenina e N-metiltiramina em *Selaginella doederleinii*. Desta forma, a fração rica em alcalóides (alcaloídica) do extrato bruto é a hidroalcoólica remanescente.

A presença de esteróides e/ou triterpenos confirma o indicado na literatura; além disso, pode-se observar que estes metabólitos estão em diversas frações, não somente na hexânica. Nas frações clorofórmio e acetato de etila, no entanto, estas estruturas são geralmente encontradas na forma heterosídica.

5.2 RESULTADOS DA ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E SUAS FRAÇÕES

Após extração por Soxhlet, concentração, filtração e repouso em refrigerador, os extratos brutos foram fracionados em escala crescente de polaridade. As principais características dos extratos brutos da amostra comercial (EB 2), e das duas partes da amostra da EMBRAPA (lenho – EBLE e córtex – EBCO) estão no quadro 4.

QUADRO 4 - CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS BRUTOS DA AMOSTRA DE *Cereus jamacaru* COMERCIAL E DA EMBRAPA (LENHO E DE CÓRTEX)

EXTRATO BRUTO	COR	ODOR	pH	RESÍDUO SECO (mg/mL)
Comercial (EB 2)	Caramelo escuro	adocicado	5,0-6,0	229,5
EMBRAPA Córtex (EB CO)	Caramelo escuro	adocicado	4,0-4,5	177,9
EMBRAPA Lenho (EB LE)	Marrom-esverdeado escuro	alcoólico	3,0-3,5	194,8

Os resíduos secos de suas frações hexano (FHEX), Diclorometano (FDCL), Acetato de Etila (FAET) e a hidroalcoólica remanescente (FHIR) de cada extrato bruto estão na tabela 4.

TABELA 4 – RESÍDUO SECO DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS BRUTOS DA AMOSTRA DE *Cereus jamacaru* COMERCIAL E DA EMBRAPA (LENHO E DE CÓRTEX)

RST (mg/mL)	FHEX (%)	FDCL (%)	FAET (%)	FHIR (%)
EBLE	5,6	13,7	6,9	73,8
EBCO	8,6	17,4	16,3	42,3
EB 2	0,3	15,9	37,6	46,2

LEGENDA: RST (mg/mL) = Resíduo Seco Total do Extrato Bruto; EB 2 = Extrato Bruto da amostra comercial; EBLE = Extrato Bruto do Lenho da amostra da EMBRAPA; EBCO = Extrato Bruto da Amostra da EMBRAPA; FHEX = Fração Hexano; FDCL = Fração Diclorometano; FAET = Fração Acetato de Etila; FHIR = Fração Hidroalcoólica Remanescente.

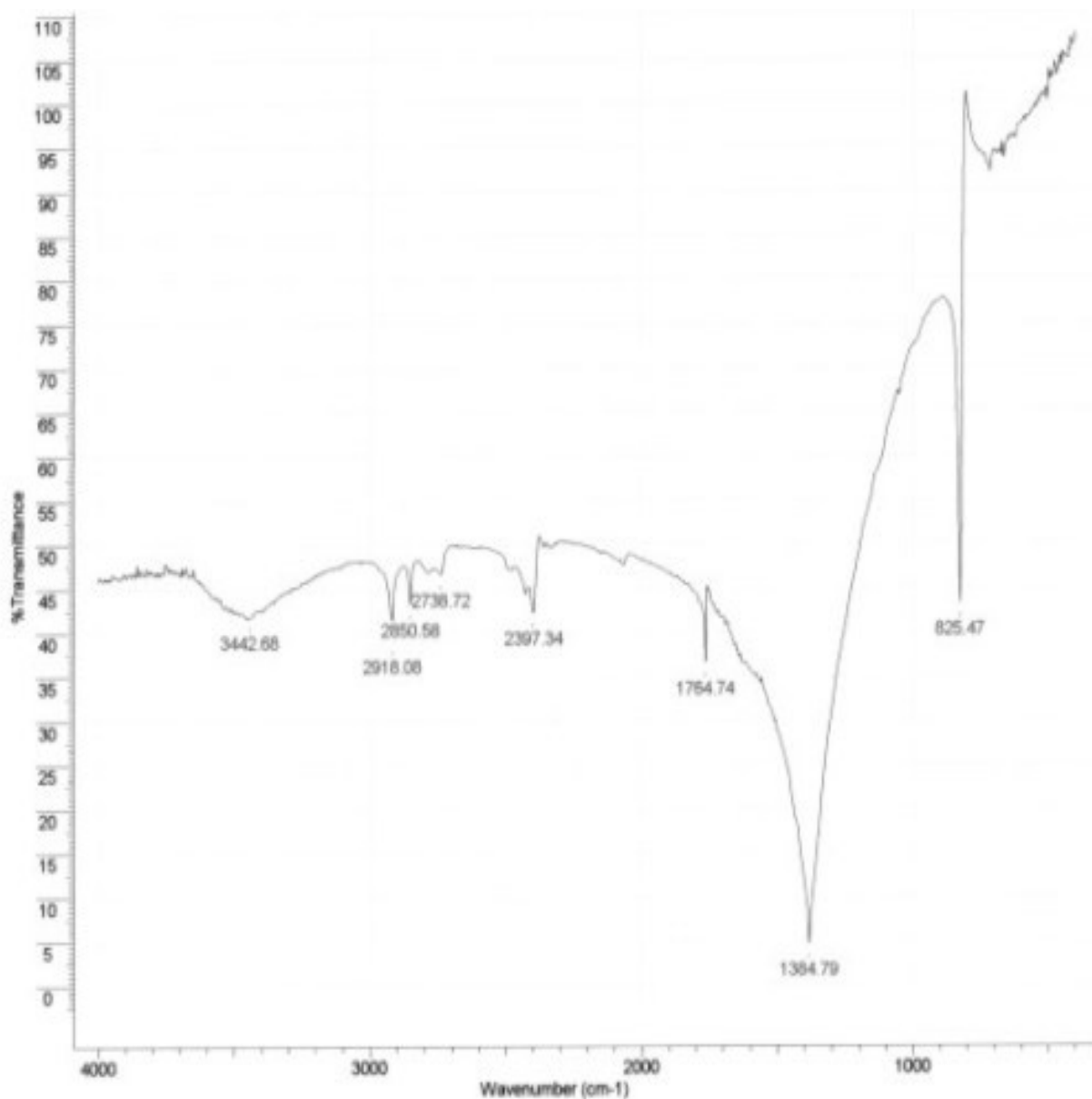
5.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES COM OS EXTRATOS BRUTOS

Os precipitados obtidos a partir dos extratos brutos da amostra comercial (EB2ppt01), extrato bruto da amostra da EMBRAPA - lenho (LEppt01) e córtex

(COppt01) - foram submetidos à espectrofotometria de infravermelho, e os espectros obtidos foram idênticos.

Os precipitados eram solúvel em água e metanol 50 %; a espectrofotometria de infravermelho (IV) foi escolhida devido ao tipo de cristalização do material – sugerindo ser um sal – e por não ter sido enquadrado em nenhuma das categorias de metabólitos testados (alcalóides, flavonóides e esteróides). A figura 17 apresenta o espectro dos precipitados.

FIGURA 17 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DOS PRECIPITADOS DOS EXTRATOS BRUTOS DA AMOSTRA COMERCIAL (EB2ppt01) E DA AMOSTRA DA EMBRAPA (LEppt01 E COppt01)



Para facilitar a visualização, o quadro 5 traz os picos encontrados na análise da figura 17.

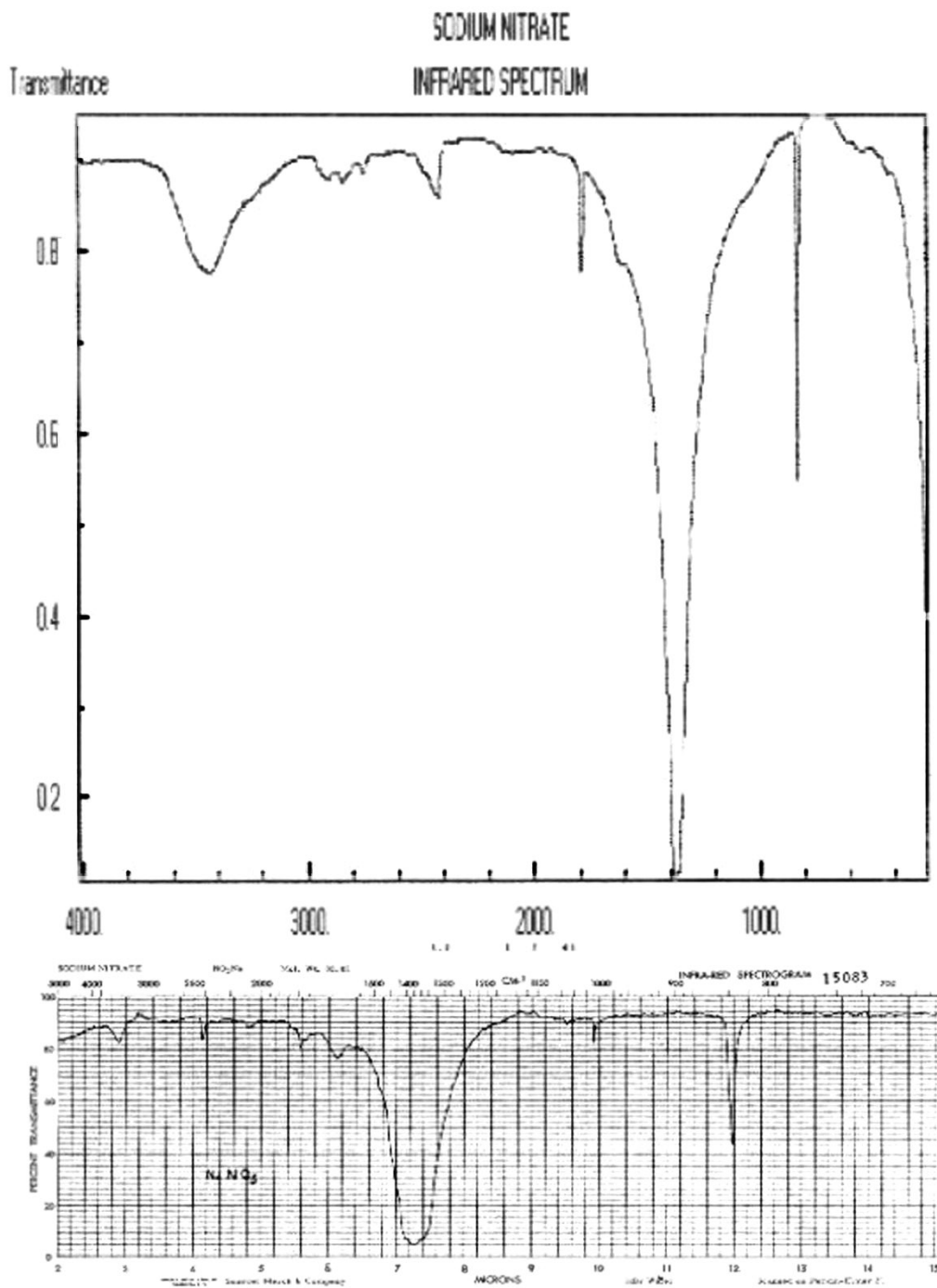
QUADRO 5 – PICOS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE IR DA AMOSTRA EB2PPT01

Identificação dos picos	NÚMERO DE ONDAS (cm ⁻¹)
1	825,47
2	1384,79
3	1764,74
4	2397,34
5	2738,72
6	2850,58
7	2918,08
8	3442,68

A análise dos picos, segundo SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991, indica que não há carbonos na substância em questão. Isto pode ser verificado porque não há coerência entre os picos para que sejam encontradas as deformações esperadas para ligações carbono-carbono ou carbono-hidrogênio. Por exemplo, grupamentos metila aparecem com deformação axial assimétrica em 2962 e simétrica 2872 cm⁻¹ e; angular simétrica em 1735 e assimétrica em 1450 cm⁻¹.

Assim, após análise dos picos, conclui-se que a substância não é orgânica e o espectro foi então comparado à literatura (NIST, 2004; STADLER, 1972). Como resultado, a comparação com o espectro do nitrato de sódio foi a mais próxima; os espectros da literatura estão na figura 18.

FIGURA 18 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO PARA PADRÃO DE NITRATO DE SÓDIO



FONTE: NIST(www.webbook.nist.gov); STADLER, 1972 (espectro 15083 IR)

É possível observar que há uma banda grande em 1300 cm^{-1} , uma pequena em 1000 cm^{-1} e outra, média, em 830 cm^{-1} . Outros sinais são semelhantes aos da amostra, como os picos em 1750 , 2300 e 2400 cm^{-1} .

5.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES COM AS FRAÇÕES HEXANO

5.4.1 Fração hexano do extrato bruto de lenho da amostra EMBRAPA

A partir da fração hexano do extrato de lenho da amostra da EMBRAPA (EBLE-FHEX) foram obtidos três precipitados LE-HEX01, LE-HEX02 e LE-HEX03. As substâncias LE-HEX01 e LE-HEX02 apresentaram o mesmo espectro de ^{13}C - RMN.

Com base nos valores dos sinais e de comparações com a literatura, concluiu-se que se trata do β -sitosterol (DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003, p. 393-394). A tabela 5 apresenta os sinais do espectro, em ppm e os respectivos carbonos; a estrutura do β -sitosterol está na figura 19 e o espectro é apresentado na figura 20.

TABELA 5 – SINAIS DE ^{13}C -RMN DAS SUBSTÂNCIAS LE-HEX01 E LE-HEX02

SINAL (ppm)	CARB	SINAL (ppm)	CARB	SINAL (ppm)	CARB
140,76	5	37,24	1	23,06	28
121,72	6	36,49	10	21,06	11
71,80	3	36,12	20	19,79	26
56,76	14	33,93	22	19,37	19
56,05	17	31,89	7, 8	19,02	27
50,13	9	31,64	2	18,75	21
45,83	24	29,14	25	11,96	29
42,30	13	28,22	16	11,83	18
42,27	4	26,06	23	-	-
39,76	12	24,29	15	-	-

LEGENDA: CARB = Carbono do β -sitosterol

FIGURA 19 – ESTRUTURA DO β -SITOSTEROL COM CARBONOS NUMERADOS

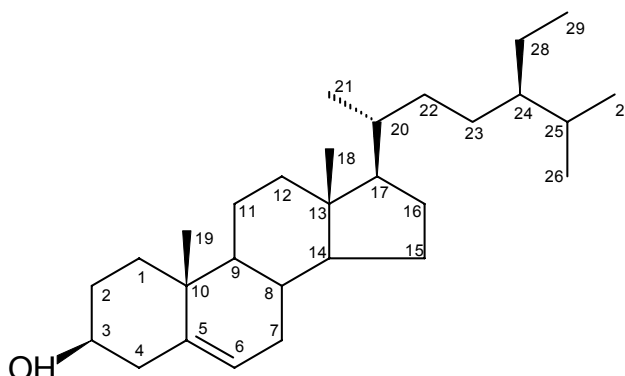
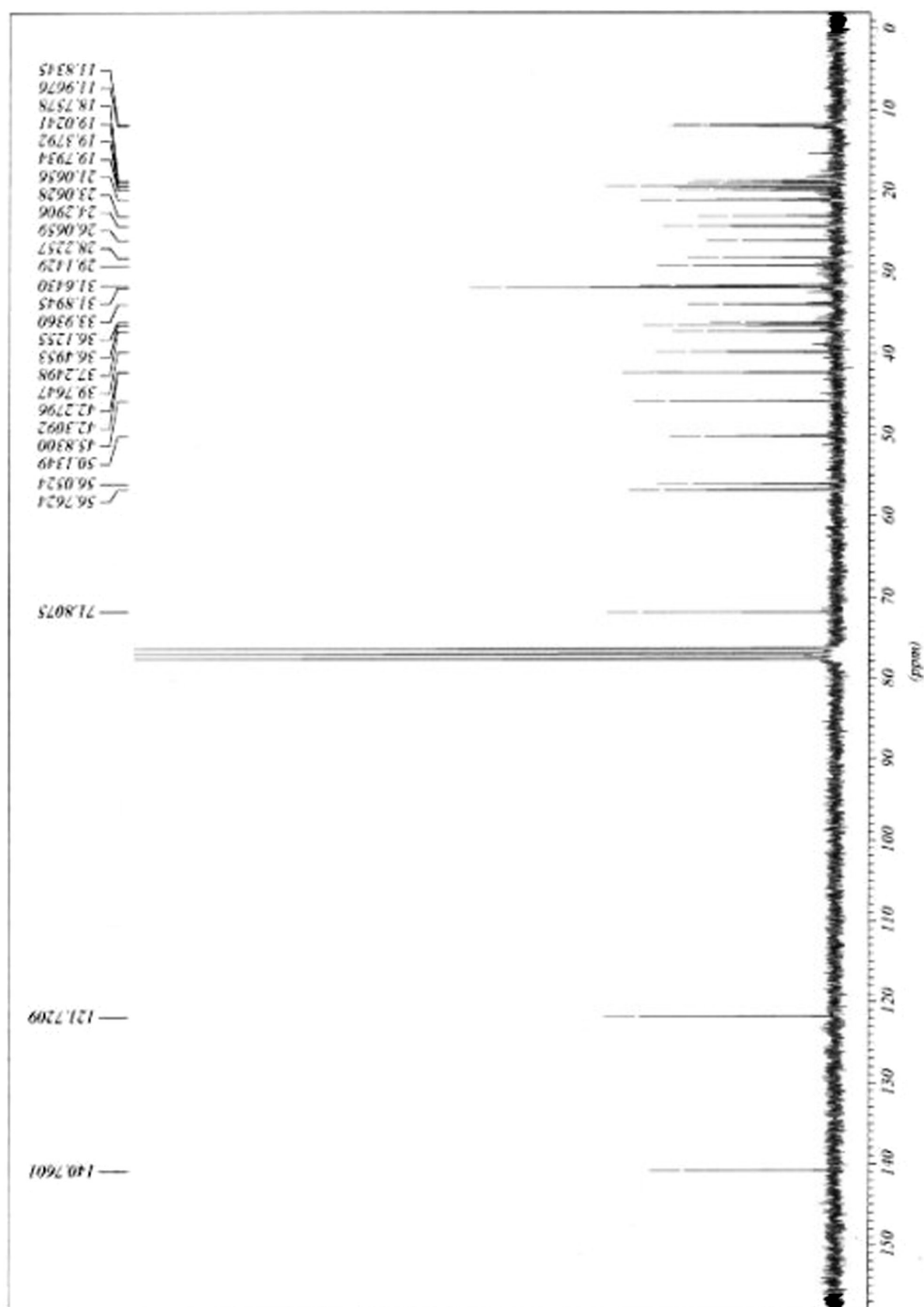


FIGURA 20 – RNM ^{13}C DE LEHEX-01 e LEHEX-02

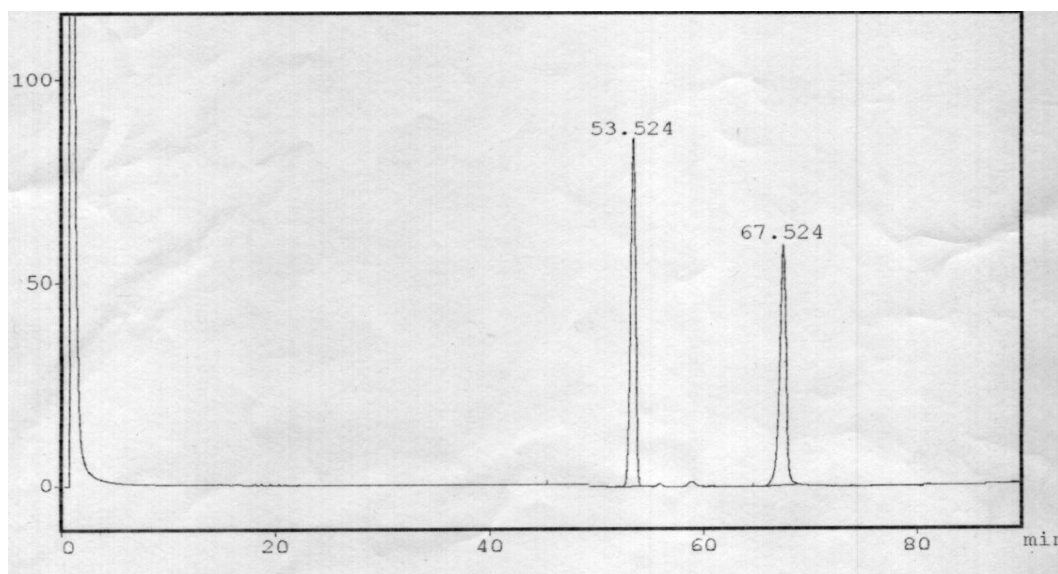
É possível observar que o espectro para os dois precipitados indica a substância β -sitosterol. A diferenciação entre o β -sitosterol e o estigmasterol, geralmente encontrados juntos, se dá pela presença de dois sinais dos carbonos 22 e 23 do estigmasterol. Nesta substância há uma dupla ligação entre eles, e os sinais estão na região de 138,31 ppm (C 22) e 129,25 ppm (C 23) (DE-EKNAMKUL e POTDUANG, 2003, p. 394). Estes sinais não estão presentes no espectro, indicando pureza nas amostras.

O terceiro precipitado, LE-HEX03, foi enviado para análise por cromatografia gasosa. Para esta análise, foi necessário injetar padrões de referência para comparação dos tempos de retenção e cálculo da retenção relativa.

a) Padrões para cromatografia gasosa

Para a análise dos cromatogramas de CG foram comparados os picos com substâncias padrão submetidas ao mesmo método (CARVALHO, 2001, p. 50). Além disso, padrões de acetato de tocoferol e β -sitosterol foram injetados no cromatógrafo nas mesmas condições de análise para controle de possíveis variações. O cromatograma apresentado na figura 21 apresenta os picos de acetato de tocoferol e β -sitosterol injetados como padrões externos, e o acetato de tocoferol como padrão interno.

FIGURA 21 – CG DOS PADRÕES ACETATO DE TOCOFEROL E β -SITOSTEROL (mV x minuto)

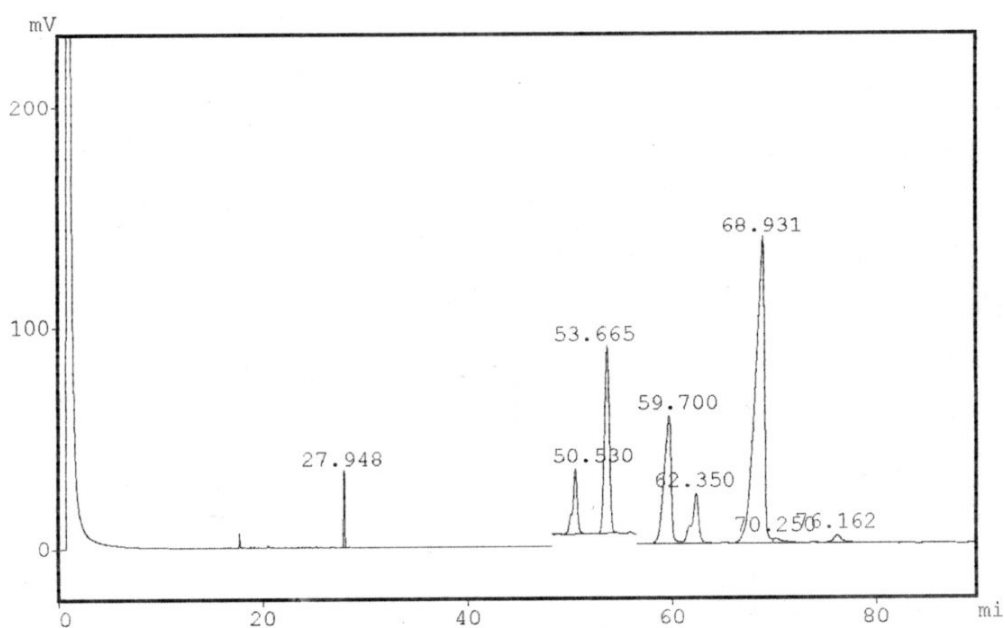


Os picos dos padrões são acetato de tocoferol em 53,524 e β -sitosterol em 67,524 minutos. Em todas as análises por CG o acetato de tocoferol foi injetado como padrão interno (co-injeção).

b) Análise de LE-HEX03 por CG

A figura 22 apresenta o cromatograma obtido por cromatografia gasosa da amostra (LE-HEX03). Pode-se observar que a amostra não estava pura. O pico em 53,665 minutos é o padrão interno acetato de tocoferol e o pico em 67,524 minutos pode ser considerado o β -sitosterol, uma vez que a retenção relativa neste caso é de 1,28. Para a confirmação desta informação, seria necessário co-injetar a amostra com padrão de β -sitosterol ou enviá-la para análise por CG-EM.

FIGURA 22 – CROMATOGRAMA GASOSA DE LE-HEX03 (mVxmin)

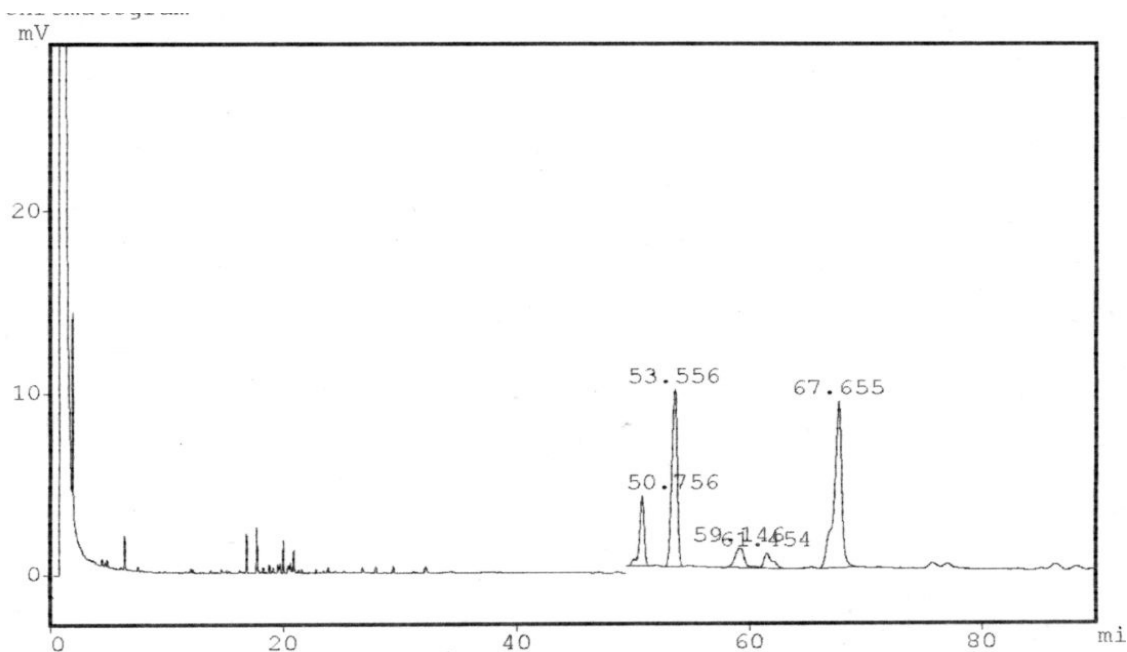


As substâncias que apresentam tempo de retenção maior que o tocoferol são, provavelmente, esteróides; estes compostos, no entanto, não foram identificados porque suas retenções relativas não são equivalentes aos compostos já testados com esta metodologia (CARVALHO, 2001, p. 67).

5.4.2 Fração hexano do extrato bruto de córtex da amostra da EMBRAPA

Cerca de 1 mL da fração foi enviado à análise por CG. A figura 23 apresenta o cromatograma.

FIGURA 23 – CROMATOGRAFIA GASOSA DA FRAÇÃO HEXANO DA AMOSTRA DA EMBRAPA - CÓRTEX (mVxmin)



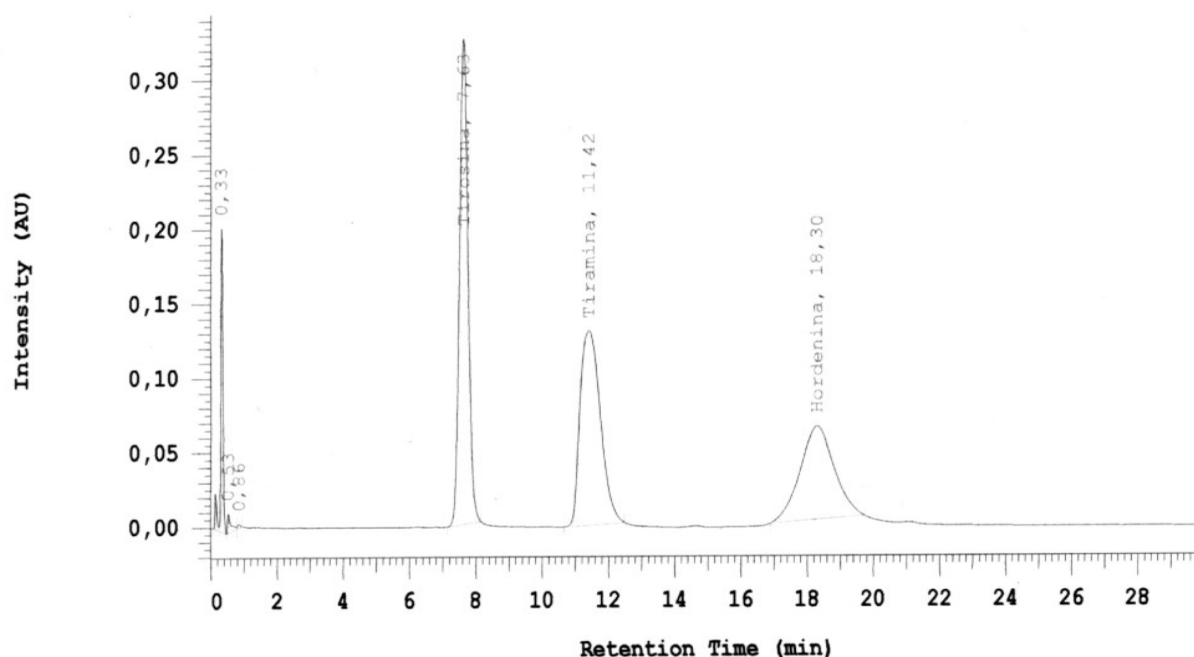
Pode-se observar em 53,556 minutos o pico do padrão interno tocoferol e em 67,655 minutos um pico correspondente ao β -sitosterol. O tempo de retenção do padrão desta substância é de 67,524 minutos. A retenção relativa do β -sitosterol é de 1,26; o pico em 67,655 minutos tem retenção-relativa de 1,26. Assim, este é o composto em maior concentração nesta amostra.

5.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE EM CLAE

5.5.1 Análise dos padrões da série homóloga tirosina, tiramina e hordenina

A figura 24 apresenta o cromatograma de CLAE para o aminoácido tirosina e as aminas tiramina e hordenina, segundo o método sugerido.

FIGURA 24 – ANÁLISE POR CLAE DOS PADRÕES DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA (0,1mg/mL), TIRAMINA (0,1 mg/mL) E HORDENINA (0,2 mg/mL) (AU x min)



É possível observar que as substâncias estão com picos bem definidos e separados.

5.5.2 Análise do produto da síntese da N-metiltiramina

Foram obtidos 26,3 mg de material, correspondentes a 52,6 % de rendimento. A síntese da N-metiltiramina foi confirmada por CCD (figura 26) e foi submetida à análise por CLAE. O cromatograma (figura 25) da injeção de amostra mais fase móvel na proporção 1+9.

FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DA ANÁLISE DO PRODUTO DE SÍNTESE DE N-METILTIRAMINA POR CLAE (AU x min)

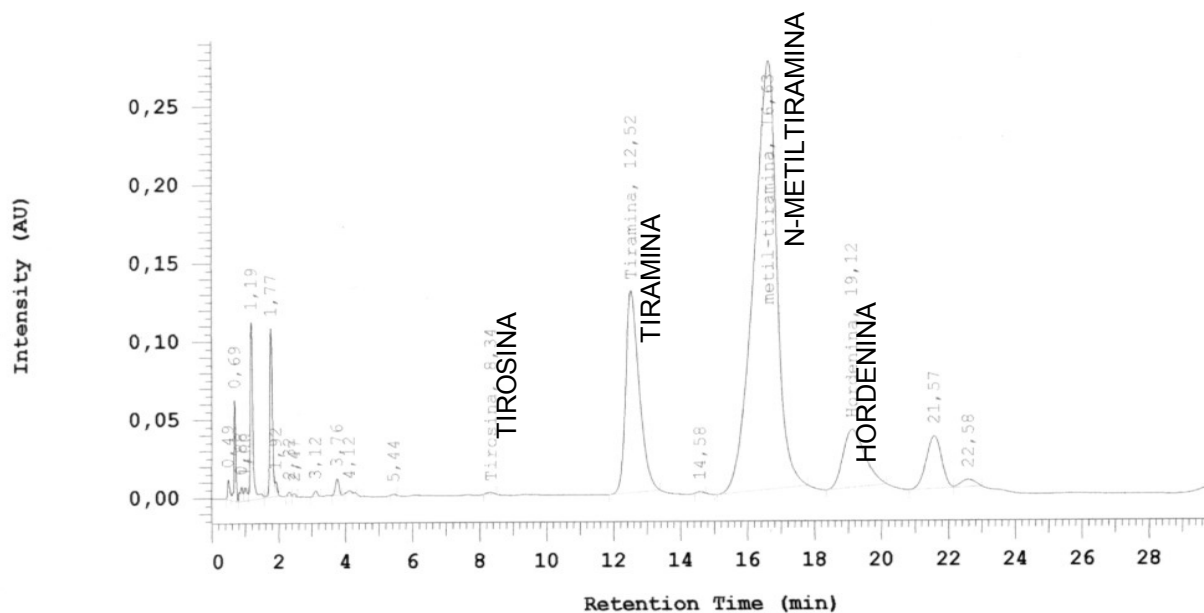
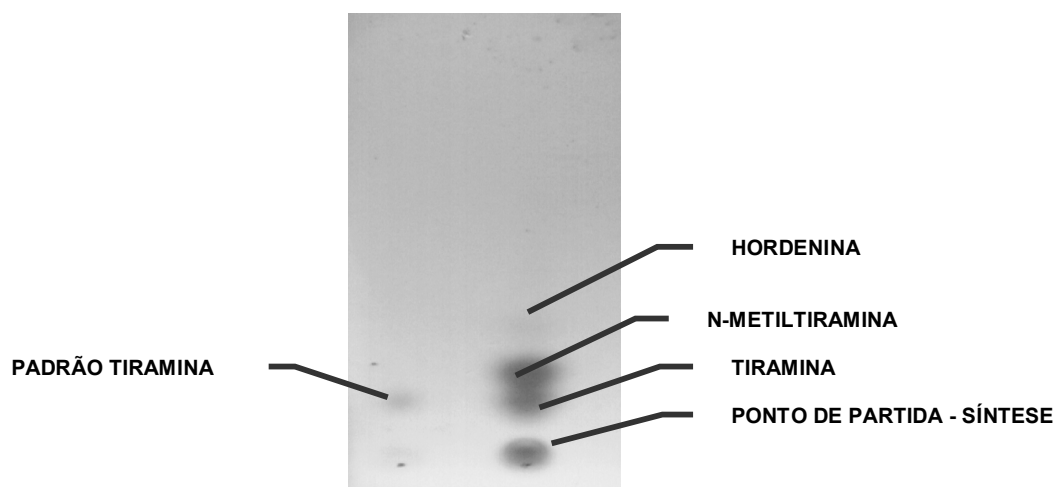


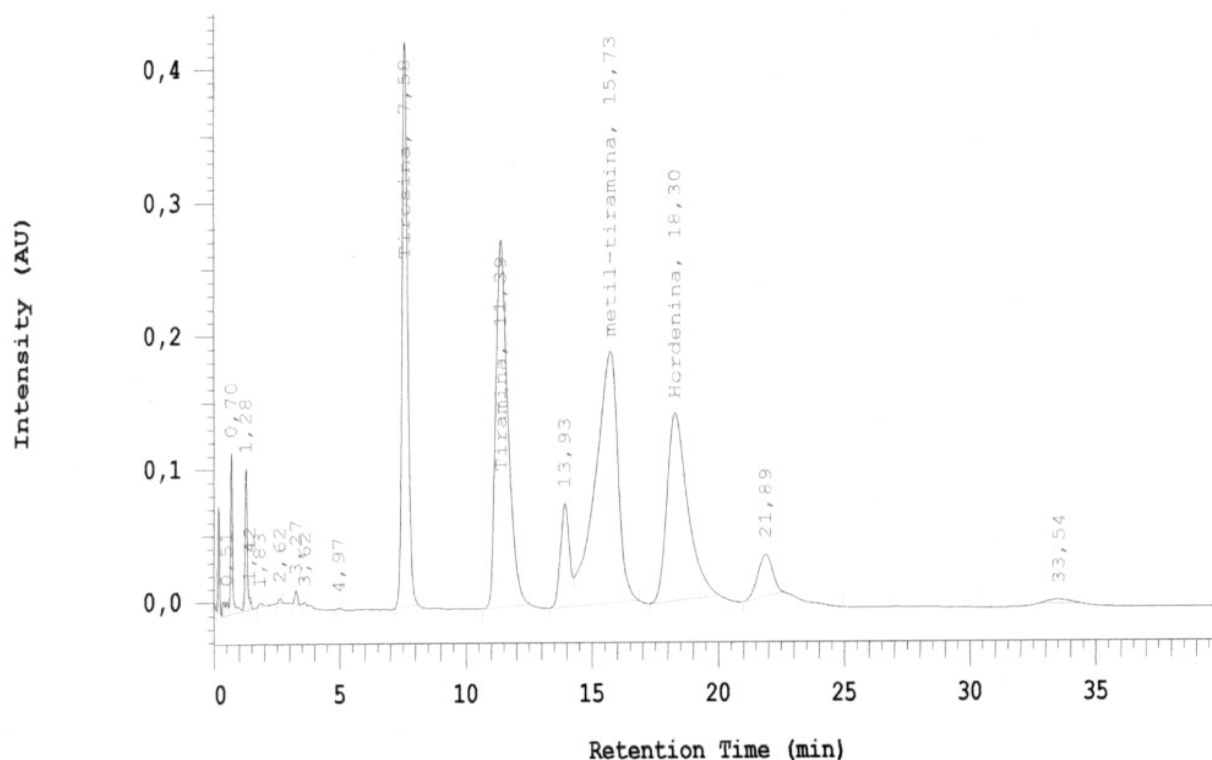
FIGURA 26 – CCD CONFIRMATÓRIA DA SÍNTESE DA N-METILTIRAMINA



FONTE: DAVET, 2005

Para confirmação das substâncias, foi feita co-injeção da amostra (síntese) com os padrões da série homóloga (figura 27).

FIGURA 27 – CO-INJEÇÃO DO PRODUTO DA SÍNTESE DE N-METILTIRAMINA E OS PADRÕES DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA E HORDENINA (AU x min)



Por meio da co-injeção foi possível confirmar a síntese da N-metiltiramina. Foram confirmados na amostra tiramina e hordenina, pois os picos destas substâncias estão mais intensos; a tirosina não foi encontrada, pois seu pico apareceu somente após a co-injeção da amostra com os padrões.

Considerando que não há padrão de referência para a N-metiltiramina, foi usada a área da tiramina para o cálculo da concentração da substância sintetizada. Desta forma, foi possível obter valor semiquantitativo do teor de N-metiltiramina, com pequena margem de erro.

De acordo com as áreas encontradas, foram obtidos 7,173 mg de N-metiltiramina, correspondendo a 14,32 % de rendimento em relação à quantidade inicial de tiramina, 27,48 % da massa final obtida e 51,19 % das aminas.

A presença de tiramina se deve, provavelmente, ao fato de que antes da reação entre o formaldeído e a tiramina é necessária a hidrólise do paraformaldeído. Esta hidrólise exige meio ácido e isto ocorreu lentamente no balão, pois conforme acontecia a hidrólise, eram liberados prótons no meio. Para que toda a tiramina

tivesse sido consumida o refluxo deveria ter sido mais longo, ou o meio deveria ter sido mais ácido (para acelerar a reação).

A hordenina está presente porque não houve purificação da síntese na etapa da formação da imina. Desta forma, quando o conteúdo foi levado à hidrogenação houve prótons suficientes para que o formaldeído liberado reagisse rapidamente com a N-metiltiramina recém-formada, produzindo a dimetilamina.

Esta síntese não foi utilizada para a quantificação de N-metiltiramina nas amostras de *Cereus jamacaru*. Isto se deve ao fato de a substância não estar pura e também à semelhança entre ela e a tiramina. Da mesma forma usada para calcular a concentração de N-metiltiramina na amostra da síntese, a área da tiramina foi usada para calcular a concentração destas duas aminas nas amostras de *Cereus jamacaru*, com alto grau de confiança.

A síntese foi extremamente importante para comprovar que a substância N-metiltiramina, pertencente à série homóloga dos padrões realmente é a substância cujo tempo de retenção está entre a tiramina e a hordenina. Além disso, foi possível sugerir a rota metabólica destes compostos no vegetal, indicando que a tiramina é convertida a N-metiltiramina no *Cereus jamacaru*.

A tabela 6 apresenta os tempos de retenção de cada substância e as áreas relativas às concentrações injetadas; estes dados serão utilizados para a identificação e quantificação destas substâncias nas amostras.

TABELA 6 – TEMPOS DE RETENÇÃO E ÁREAS DOS PICOS DOS PADRÕES TIROSINA 0,1 mg/mL, TIRAMINA 0,1 mg/mL E HORDENINA 0,2 mg/mL

PADRÃO	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	ÁREA DO PICO	TEMPO RETENÇÃO (min)
TIROSINA	0,1	2860322	7,63
TIRAMINA	0,1	2757310	11,42
N-METILTIRAMINA*	0,1	2757310	15,80
HORDENINA	0,2	2236429	18,30

*NOTA: Dados baseados na área e concentração da tiramina

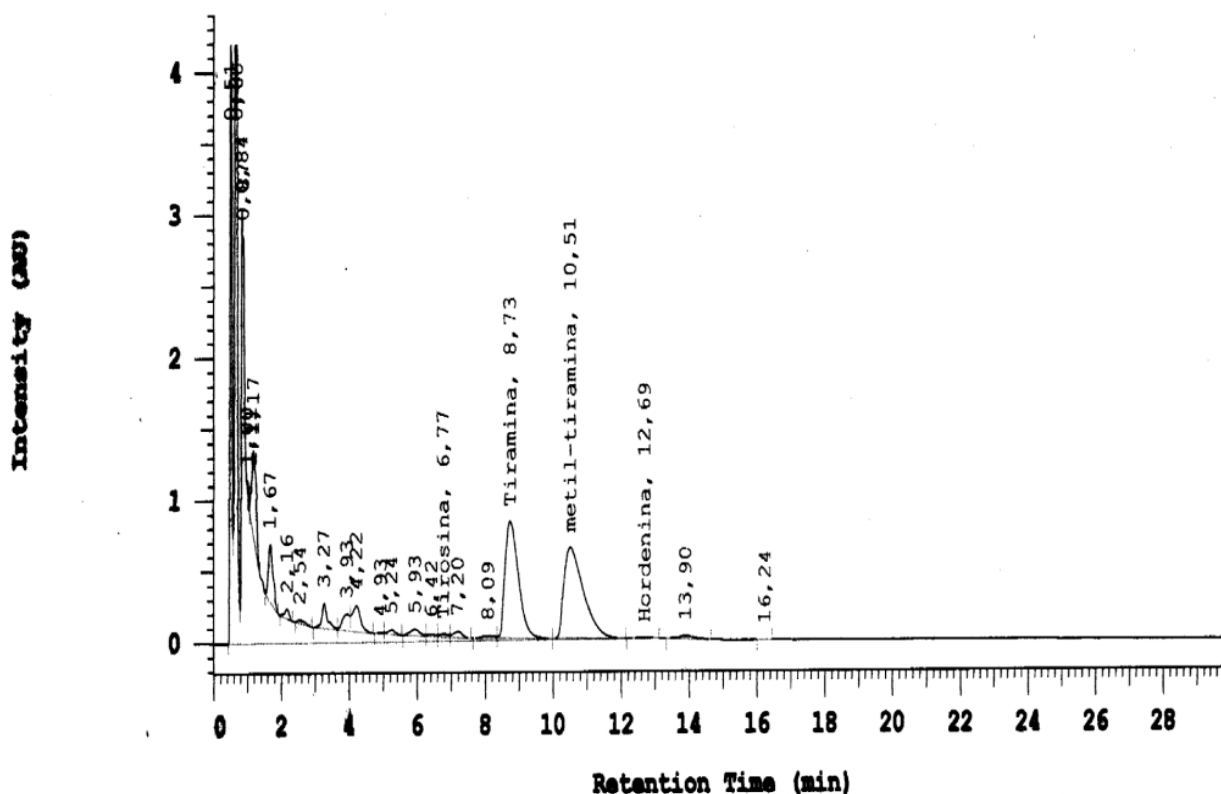
5.6 RESULTADOS DAS ANÁLISES POR CLAE

5.6.1 Extratos brutos

Os extratos brutos de lenho, de córtex e da amostra comercial de *Cereus jamacaru* apresentaram diferentes composições em relação à série homóloga tirosina, tiramina, N-metiltiramina e hordenina. Todas as análises foram verificadas por c-injeção com os padrões.

A figura 28 traz o cromatograma por CLAE de EB2.

FIGURA 28 – CROMATOGRAMA POR CLAE DE EB2 PARA ANÁLISE DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA (AU x min)



Observa-se que os tempos de retenção estão adiantados em relação à tabela 6, que apresenta o comportamento dos padrões. Esta alteração foi observada em várias amostras e em todas a fase móvel havia sido preparada no dia da análise. Para evitar dúvidas, todas as amostras foram re-injetadas com os padrões (co-

injeção). Futuramente, durante o processo de validação da metodologia, o tempo de preparo da fase móvel deve ser levado em consideração.

O resumo das quantificações está apresentado na tabela 7.

TABELA 7 – QUANTIFICAÇÃO POR CLAE DOS COMPONENTES DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA NAS AMOSTRAS DE EXTRATO BRUTO EBCO, EBLE E EB2

EXTRATO	TIRO		TIRA		NMT		HOR	
	(mg/mL)	% EB	(mg/mL)	%EB	(mg/mL)	%EB	(mg/mL)	%EB
EBLE	0,0216	0,011	0,7418	0,370	0,0831	0,043	0,0820	0,042
EBCO	0,0493	0,027	0,2261	0,130	0,0591	0,033	0,0500	0,028
EB2	0,0731	0,032	4,4649	1,945	5,0699	2,209	0,1035	0,045

LEGENDA: TIRO= Tirosina; TIRA= Tiramina; NMT= N-metiltiramina; HOR= Hordenina; ND = Não detectável; EB= porcentagem da substância em relação ao resíduo seco do extrato bruto

Observa-se que a tiramina é o principal componente dos extratos de lenho e de córtex, enquanto a N-metiltiramina predomina no extrato comercial. Isto pode sugerir que a maior quantidade de N-metiltiramina livre esteja em outras partes da planta, como a cutícula e os vasos, que não foram retiradas na confecção do extrato comercial. Outra possibilidade é a localização dos espécimes utilizados para os extratos. A amostra da EMBRAPA foi colhida no Estado de Pernambuco e a amostra comercial foi colhida na Bahia. Locais de coleta diferentes significam ecossistemas diferentes, podendo levar a diferentes associações com animais ou insetos locais e, conseqüentemente, a variações na composição de substâncias ativas como resposta a estímulos diversos (REIS e MARIOT, 2001, p. 42).

5.6.2 Frações hidroalcoólicas remanescentes

A tabela 8 apresenta os resultados da quantificação por CLAE das frações hidroalcoólicas remanescentes (EBLE-FHIR, EBCO-FHIR e EB2-FHIR), comparando-os com o resultados das extrações ácido-base para cada uma destas amostras.

TABELA 8 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO POR CLAE DAS SUBSTÂNCIAS DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA NAS FRAÇÕES HIDROALCOÓLICAS REMANESCENTES ANTES E DEPOIS DA EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE

Substância	<i>EBCO-FHIR (mg/100 mL)</i>		<i>EBLE-FHIR (mg/100 mL)</i>		<i>EB2-FHIR (mg/100 mL)</i>	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
TIRO	3,93	0,27	2,10	0,04	28,38	0,18
TIRA	26,66	0,23	52,36	146,50	406,75	126,88
NMT	4,92	5,62	6,29	20,52	451,00	425,93
HOR	0,12	0,17	ND	0,47	26,70	49,58

LEGENDA: TIRO= Tirosina; TIRA= Tiramina; NMT= N-metiltiramina; HOR= Hordenina; ND = Não detectável

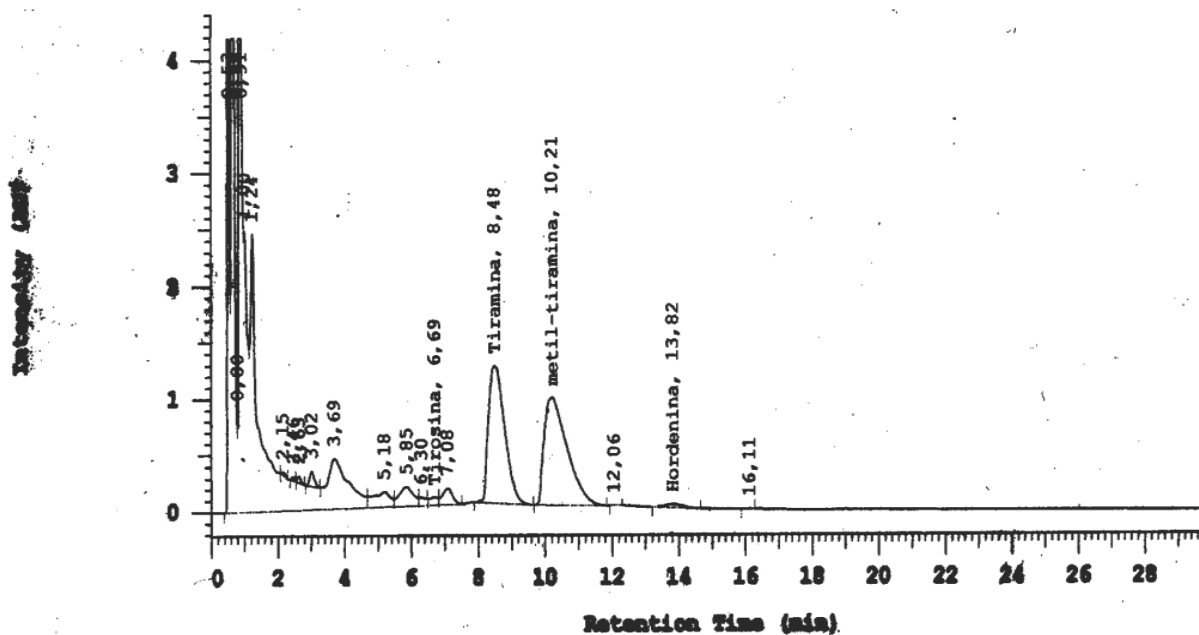
Antes de comparar os resultados obtidos a partir das frações hidroalcoólicas remanescentes com os resultados do extrato bruto, é importante ressaltar que a partição líquido-líquido foi realizada com parte do extrato bruto e não de todo o volume obtido. O objetivo aqui é a comparação entre as quantidades antes e após a extração ácido-base.

Observa-se que a extração ácido-base foi capaz de aumentar a liberação de aminas (tiramina e N-metiltiramina). A N-metiltiramina superou a quantidade de tiramina na amostra comercial e o oposto ocorreu com o lenho. A fração hidroalcoólica remanescente de córtex foi a que apresentou menos substâncias da série homóloga em questão.

A tirosina foi extraída, preferencialmente, pela fração ácida da extração.

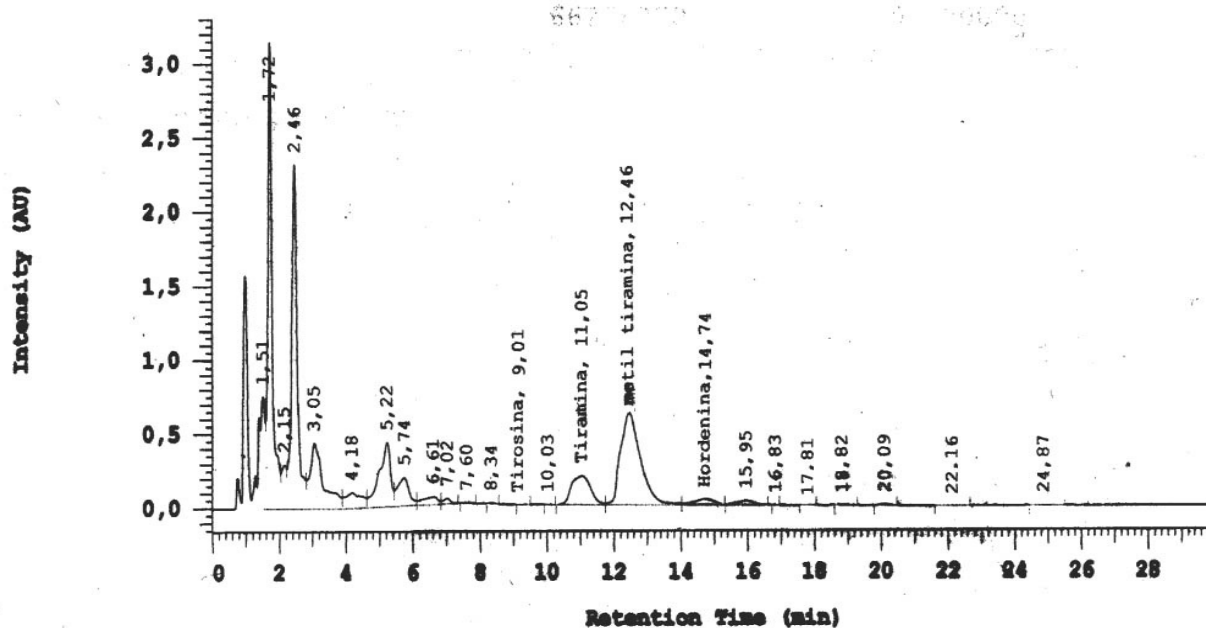
A figura 29 apresenta o cromatograma por CLAE da análise da amostra EB2-FHIR antes da extração ácido-base.

FIGURA 29 – CROMATOGRAMA POR CLAE DE EB2-FHIR PARA ANÁLISE DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA (AU x min)



A figura 30 apresenta o cromatograma por CLAE da fração básica da amostra EB2-FHIR após a extração ácido-base.

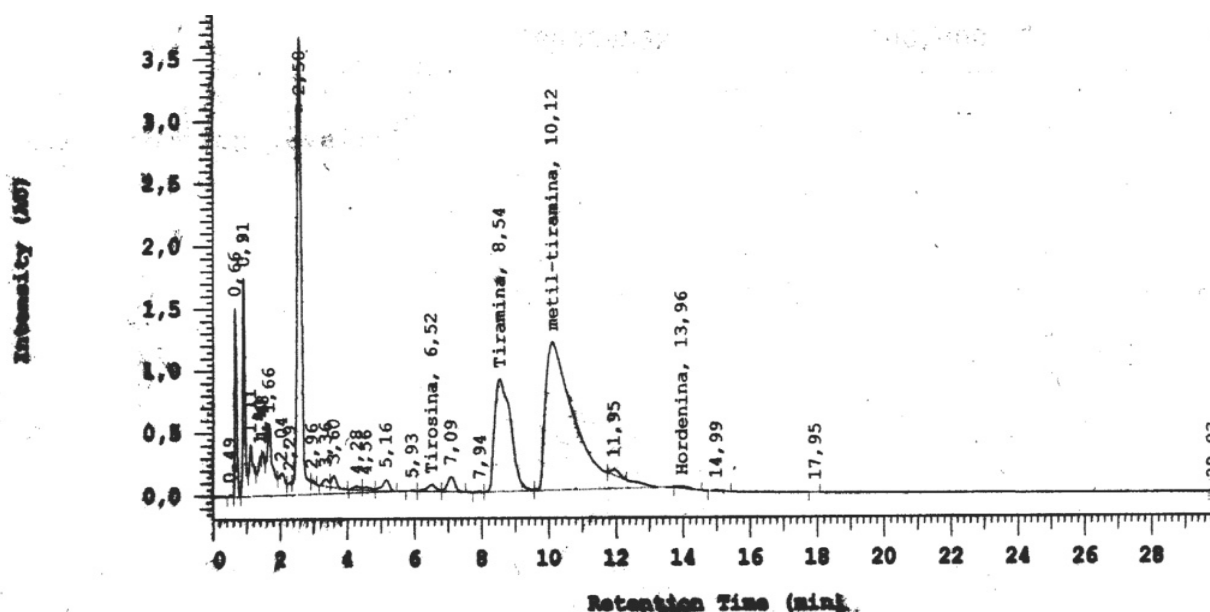
FIGURA 30 – CROMATOGRAMA POR CLAE DE EB2-FHIR APÓS EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE, PARA ANÁLISE DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA (AU x minutos)



Neste caso, assim como em outras injeções, os tempos de retenção dos padrões não se repetem. Novamente, a fase móvel havia sido preparada no dia da injeção. Para confirmar os picos, foi feita a co-injeção com os padrões e as indicações das substâncias da série homóloga analisada estão na figura.

É possível que a quantidade de amins livres tenha aumentado com a extração ácido-base, considerando-se que as amins podem estar ligadas a outros compostos (LIN *et al.*, 1991, p. 188). Para a confirmação da suspeita, a amostra EB2-FHIR foi submetida ao tratamento ácido para hidrólise; o cromatograma está na figura 31.

FIGURA 31 – CROMATOGRAMA POR CLAE DE EB2-FHIR APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA, PARA ANÁLISE DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA (AU) x min)



Como resultado do tratamento ácido para hidrólise, obteve-se: 17,3 mg de tirosina, 295,9 mg de tiramina, 731,3 mg de N-metiltiramina e 6,1 mg de hordenina em 100 mL de EB2-FHIR. Este resultado indicou o aumento da liberação de amins pela presença do ácido sob refluxo.

Com base nos resultados obtidos, foi calculada a concentração das substâncias da série homóloga da tiramina nas amostras de planta. Para tanto, foram utilizados os dados das extrações ácido-base das frações hidroalcoólicas

remanescentes de EBCO e EBLE. Para o cálculo da amostra comercial, foram utilizados os resultados do tratamento ácido. Os resultados estão na tabela 9.

TABELA 9 – QUANTIDADE DAS SUBSTÂNCIAS DA SÉRIE HOMÓLOGA TIROSINA, TIRAMINA, N-METILTIRAMINA E HORDENINA NAS AMOSTRAS DE *Cereus jamacaru* (mg/100g)

AMOSTRA	TIRO (mg/100g)	TIRA (mg/100g)	NMT (mg/100g)	HOR (mg/100g)
LENHO*	0,008	28,491	3,991	0,001
CÓRTEX*	0,065	0,053	1,335	0,042
COMERCIAL	5,616	96,340	238,10	2,006

LEGENDA: TIRO= Tirosina; TIRA= Tiramina; NMT= N-metiltiramina; HOR= Hordenina; ND = Não detectável

NOTA: * Amostras fornecidas pela EMBRAPA

5.7 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

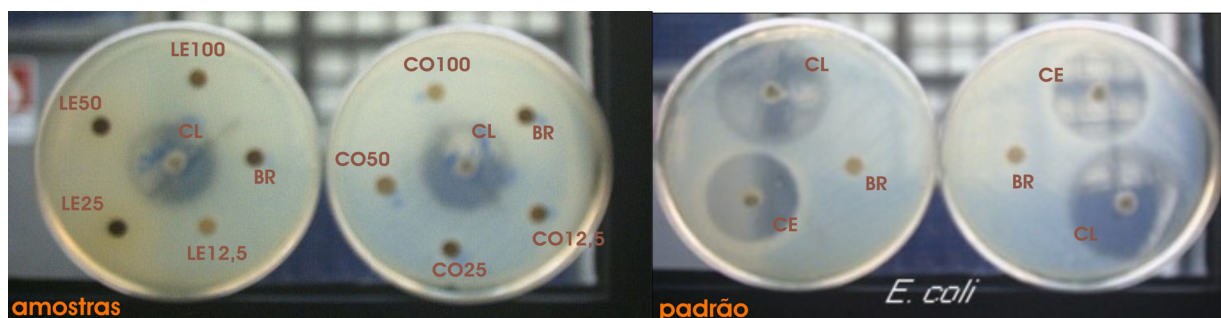
5.7.1 Difusão em ágar

Os resultados dos testes de difusão em ágar estão apresentados a seguir. A tabela 10 apresenta as concentrações de sólidos testadas.

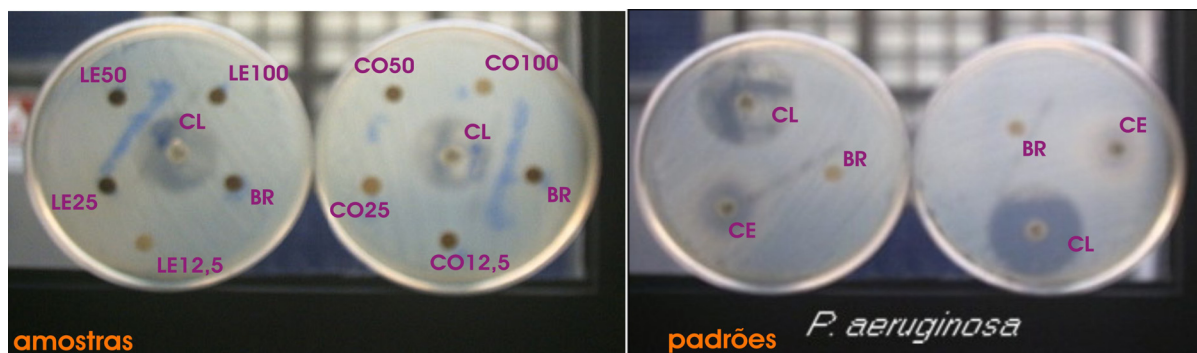
TABELA 10 – CONCENTRAÇÕES DE EBCO E EBLE EM RELAÇÃO AOS RESÍDUOS SECOS

CONCENTRAÇÃO	EBLE		EBCO	
	Resíduo seco mg/mL	Conc. Sólidos mg/10 µl	Resíduo seco mg/mL	Conc. Sólidos mg/10 µl
100	177,90	$177,90 \times 10^{-2}$	194,80	$194,80 \times 10^{-2}$
50	88,95	$88,95 \times 10^{-2}$	97,40	$97,40 \times 10^{-2}$
25	44,47	$44,47 \times 10^{-2}$	48,70	$48,70 \times 10^{-2}$
12,5	22,24	$22,24 \times 10^{-2}$	24,35	$24,35 \times 10^{-2}$

As figuras de 32 e 33 trazem a comparação entre as placas com padrões de 30 µg (cloranfenicol e cefalotina) e controle (etanol) e as placas com os extratos para os microorganismos *E. coli* e *P. aeruginosa*.

FIGURA 32 – COMPARATIVO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A *Escherichia coli*

NOTA: Os extratos estão identificados como LE (lenho) e CO (córtex), e as diluições por números; o controle de etanol como BR e os padrões CE (cefalotina) e CL (cloranfenicol)

FIGURA 33 - COMPARATIVO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*

NOTA: Os extratos estão identificados como LE (lenho) e CO (córtex), e as diluições por números; o controle de etanol como BR e os padrões CE (cefalotina) e CL (cloranfenicol)

Estas figuras são representativas de todas as placas para os microorganismos testados. De acordo com os resultados apresentados, os extratos de córtex e de lenho não inibiram o crescimento de microorganismos pelo método de difusão em ágar. Seria possível supor problemas com o método ou com o material utilizado; entretanto, os padrões apresentaram resultados dentro do esperado (halos de inibição) e o controle (etanol) não apresentou crescimento - demonstrando que a presença de etanol não exerce influência sobre a atividade do extrato. Pode-se inferir, no entanto, que ou as substâncias presentes nos extratos não apresentam atividade antimicrobiana, ou não houve difusão no meio. Esta última merece especial atenção uma vez que o extrato mostrou-se rico em substâncias lipofílicas, esteróides por exemplo, que não se difundem em meio sólido hidrofílico. Os resultados dos testes de concentração inibitória mínima devem ser considerados, como segue.

5.7.2 Concentração inibitória mínima (MIC)

5.7.2.1 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos

Os resultados dos testes de MIC estão apresentados nas figuras de 34 a 36. A última diluição em que não houve crescimento de microorganismo (diluição MIC) está marcada com seta vermelha.

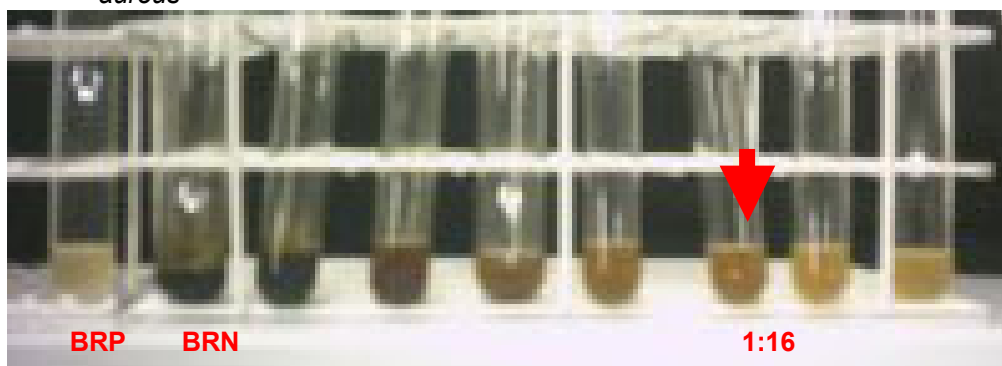
A inibição mais expressiva foi do córtex, especialmente contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*. Nestes casos a MIC foi 1:16. A inibição em relação ao *S. epidermidis* foi a maior, onde MIC foi 1:32.

FIGURA 34 – MIC DE CÓRTEX DE *Cereus jamacaru* SOBRE O CRESCIMENTO DE *Pseudomonas aeruginosa*

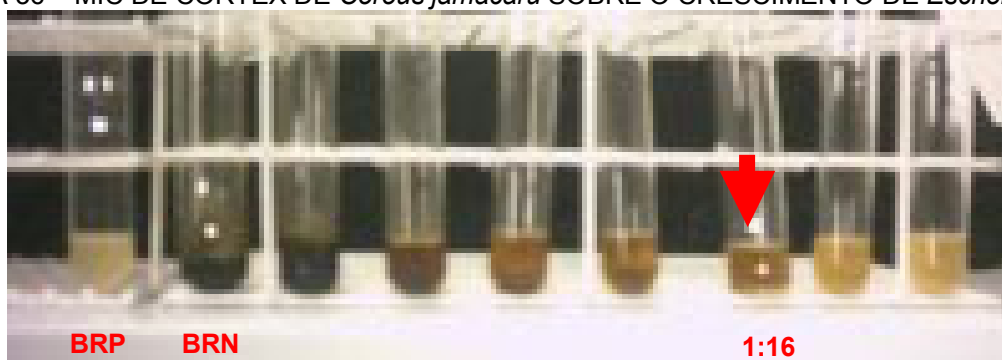


NOTA: o tubo indicando BRP corresponde ao Controle positivo (com crescimento, sem extrato); BRN Controle Negativo (com extrato, sem inóculo); a seta indica a diluição em que houve crescimento (MIC)

FIGURA 35 – MIC DE CÓRTEX DE *Cereus jamacaru* SOBRE O CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus*



NOTA: o tubo indicando BRP corresponde ao Controle positivo (com crescimento, sem extrato); BRN Controle Negativo (com extrato, sem inóculo); a seta indica a diluição em que houve crescimento (MIC)

FIGURA 36 – MIC DE CÓRTEX DE *Cereus jamacaru* SOBRE O CRESCIMENTO DE *Escherichia coli*

NOTA: o tubo indicando BRP corresponde ao Controle positivo (com crescimento, sem extrato); BRN Controle Negativo (com extrato, sem inoculo); a seta indica a diluição em que houve crescimento (MIC)

Como pode ser observado na tabela 11, a inibição mais expressiva foi de EBCO.

TABELA 11 – RESULTADOS DE MIC PARA EXTRATOS BRUTOS DE *Cereus jamacaru* (mg/mL) DA AMOSTRA EMBRAPA

MICROORGANISMO	EXTRATO (mg/mL)	
	EBLE	EBCO
<i>Streptococcus pyogenes</i>	88,95	97,40
<i>Streptococcus epidermidis</i>	88,95	3,04
<i>Staphylococcus aureus</i>	88,95	6,09
<i>Proteus mirabilis</i>	44,47	12,17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44,47	6,09
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	88,95	24,35
<i>Escherichia coli</i>	88,95	6,09
<i>Salmonella thyphimurium</i>	88,95	48,70

LEGENDA: MIC= Concentração Inibitória Mínima; CONC= Concentração de sólidos em mg/mL

Desta forma, pode-se concluir que os extratos de lenho (EBLE) e córtex (EBCO) apresentam atividade antimicrobiana para os microorganismos testados. O córtex, no entanto apresentou significativa diferença em relação a alguns microorganismos.

O melhor resultado, ou seja, a menor concentração capaz de inibir o crescimento de microorganismos foi de 3,0438 mg/mL (tubo 1:32) de extrato bruto de córtex sobre *Streptococcus epidermidis*. Outros resultados expressivos foram o tubo 1:16 (6,0875 mg/mL) de EBCO sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Este último foi o microorganismo mais sensível ao extrato EBCE na concentração 44,475 mg/mL (tubo 1:2).

Desta forma, pode-se inferir que a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos de *Cereus jamacaru* pode estar relacionada a compostos lipofílicos. BELTRAME *et al.* (2002, p. 4) testaram a atividade antimicrobiana do β -sitosterol pelo ensaio de MIC. Concluiu-se, neste estudo, que esta substância inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* em concentração maior que 100 $\mu\text{g/mL}$ e *B. subtilis* com 50 $\mu\text{g/mL}$. Considerando os resultados obtidos nas análises de CG para as frações hexano dos extratos de *Cereus jamacaru*, observa-se a predominância de β -sitosterol. Isto pode ser indicativo de que as substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana podem ser esteróides. Sabe-se, no entanto, que as atividades biológicas apresentadas pelas plantas são resultado *grossa modo* do efeito sinérgico das substâncias que a compõem.

5.7.2.2 Atividade antimicrobiana da tiramina

A tiramina foi capaz de inibir o crescimento de alguns dos microorganismos testados. Os resultados estão na tabela 12.

TABELA 12 – RESULTADO DO TESTE DE MIC PARA A TIRAMINA

TIRAMINA ($\mu\text{g/mL}$)								
	<i>S.pyi</i>	<i>S.epi</i>	<i>S.aur</i>	<i>P.mir</i>	<i>P.aer</i>	<i>K.pne</i>	<i>E.col</i>	<i>S.thy</i>
MIC	1000	500	1000	1000	1000	1000	1000	1000

LEGENDA: *S.pyi*= *Streptococcus pyogenes*; *S.epi*= *Streptococcus epidermidis*; *S.aur*= *Staphylococcus aureus*; *P.mir*= *Proteus mirabilis*; *P.aer*= *Pseudomonas aeruginosa*; *K.pne*= *Klebsiella pneumoniae*; *E.col*= *Escherichia coli*; *S.thy*= *Salmonella thyphimurium*; MIC = Concentração inibitória Mínima

É importante ressaltar, no entanto, que a concentração inibitória da tiramina é muito alta, podendo significar que a inibição ocorreu por osmolaridade e não por processos de inibição de síntese de ácidos nucleicos, de enzimas ou mesmo por alterações no pH do meio (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1988, p. 545). Este resultado não indica ausência de atividade antimicrobiana, mas sim que o uso desta substância para fins terapêuticos seria inviável por ser necessária dose elevada para o efeito esperado. Além de existirem outras opções mais viáveis, as ações farmacológicas da tiramina sobre a liberação de catecolaminas são bastante

conhecidas e poderia significar efeito colateral (no caso do uso como antibacteriano) pronunciado.

Considerando os resultados encontrados nos extratos brutos, pode-se admitir que a atividade antimicrobiana apresentada não está relacionada à presença de tiramina nas amostras.

5.8. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

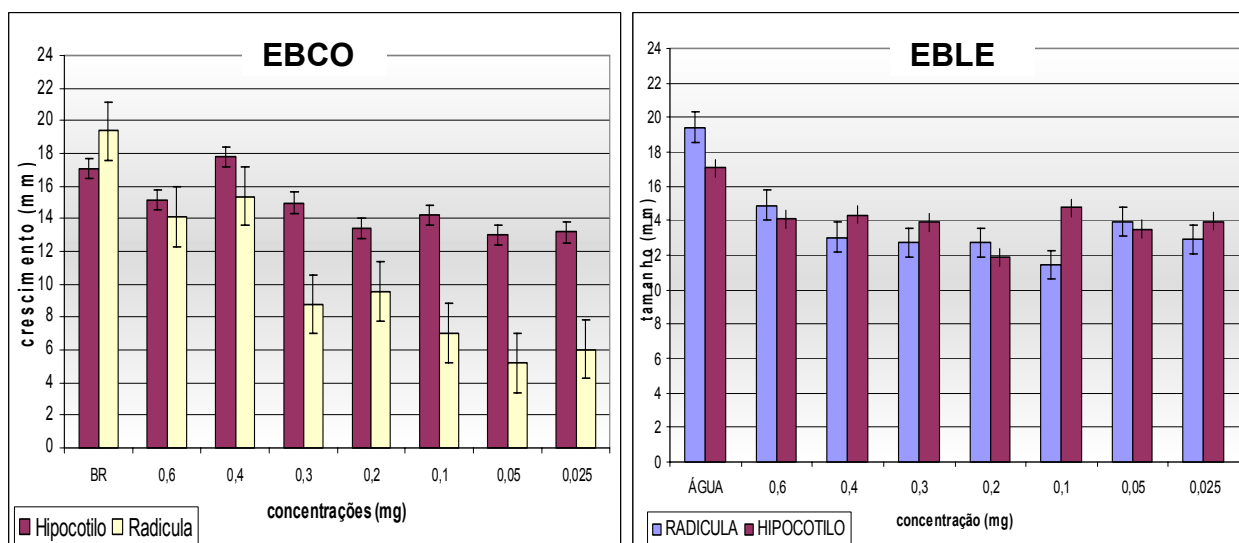
5.8.1 Avaliação da atividade alelopática dos extratos brutos de córtex e de lenho da amostra da EMBRAPA (EBCO e EBLE)

5.8.1.1 Influência sobre o crescimento

Os extratos brutos de córtex e de lenho de *Cereus jamacaru* alteraram o crescimento de radícula e hipocótilo de sementes de alface após seis dias de incubação.

O gráfico 1 apresenta o comparativo das atividades.

GRÁFICO 1 – COMPARATIVO DE CRESCIMENTO DE RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* INCUBADAS COM EBCO E EBLE (CRESCIMENTO EM mm X CONCENTRAÇÃO EM mg)



LEGENDA: Cores: em VERMELHO = hipocótilo; em AZUL ou AMARELO = radícula; cada coluna representa a média mais erro padrão de crescimento de dez sementes em quatro repetições.

É possível observar, segundo o gráfico 1, todas as concentrações dos extratos afetaram o crescimento da plântula. Vale destacar que a concentração de EBCO que mais afetou o crescimento do hipocótilo e da radícula foi 0,05 mg; a concentração mais ativa de EBLE foi de 0,2 mg para o hipocótilo e 0,1 mg para a radícula.

Estes resultados foram submetidos à análise estatística por dois métodos: ANOVA e Scott-Knott. O primeiro avalia se há diferença estatística entre os tratamentos por comparação das médias; o segundo indica quais tratamentos são estatisticamente diferentes entre si, reagrupando os tratamentos de acordo com suas semelhanças estatísticas (a_1, a_2, \dots). Neste teste, é esperado de as repetições correspondentes ao controle com água estejam no grupo de maior média de crescimento.

Segundo o teste de ANOVA, os tratamentos apresentaram diferença estatística em relação ao controle, com valor de $P < 0,01$, e F crítico maior que o F obtido. Isto significa que para este conjunto de dados deve-se rejeitar a hipótese nula (H_0), ou seja, deve-se rejeitar a hipótese de que os tratamentos são iguais.

O teste de Scott-Knott indicou, com 95% de confiança, que todas as concentrações de EBLE são diferentes do controle com água em relação à radícula; isto significa que a menor concentração (0,025 mg) já é suficiente para alterar o crescimento. A concentração 0,2 mg foi a única totalmente diferente do controle com água para o hipocótilo. As outras concentrações tiveram comportamentos diferentes dependendo da repetição, gerando dúvida com relação à sua influência sobre o crescimento do hipocótilo. O quadro 6 traz os dados para esta análise.

QUADRO 6 – TESTE SCOTT-KNOTT PARA CRESCIMENTO DE SEMENTES (*Lactuca sativa*) TRATADAS COM EBLE

EBLE - HIPOCÓTILO				EBLE - RADÍCULA		
TRAT	RESULTADO	GRUPO		TRAT	RESULTADO	GRUPO
271	6.80	a1		253	8.20	a1
242	9.60	a1		241	9.70	a1
241	10.60	a1		254	9.90	a1
263	11.20	a1		271	10.20	a1
<u>202</u>	<u>11.90</u>	<u>a1</u>		242	10.60	a1
232	12.20	a1		234	11.50	a1
212	12.20	a1		232	11.90	a1
253	12.80	a1		274	12.00	a1
274	12.90	a1		222	12.10	a1
222	13.10	a1		243	12.20	a1
233	13.40	a1		223	12.40	a1
221	13.40	a1		233	12.50	a1
213	13.40	a1		261	12.50	a1
261	13.50	a1		221	13.00	a1
243	13.60	a1		244	13.10	a1
244	13.80	a1		251	13.20	a1
262	13.90	a1		263	13.60	a1
254	14.00	a1		273	13.90	a1
234	14.50	a2		211	14.00	a1
211	14.70	a2		<u>202</u>	<u>14.40</u>	<u>a1</u>
224	15.10	a2		262	14.50	a1
264	15.40	a2		252	14.50	a1
231	15.50	a2		224	14.70	a1
214	15.60	a2		212	14.70	a1
273	15.80	a2		231	15.00	a1
223	15.80	a2		213	15.10	a1
<u>203</u>	<u>16.40</u>	<u>a2</u>		264	15.20	a1
252	16.40	a2		272	15.60	a1
251	16.60	a2		214	15.80	a1
272	16.80	a2		<u>203</u>	<u>19.40</u>	<u>a2</u>
<u>201</u>	<u>19.00</u>	<u>a2</u>		<u>204</u>	<u>21.30</u>	<u>a2</u>
<u>204</u>	<u>21.00</u>	<u>a2</u>		<u>201</u>	<u>22.50</u>	<u>a2</u>

LEGENDA: TRAT= Tratamento: XYZ, onde X= 2 corresponde a EBLE, Y é a concentração (de controle com água =0 a 0,025 mg =7) e Z é a repetição (1 a 4). Os tratamentos correspondentes à água estão sublinhados.

As concentrações de EBCO estatisticamente diferentes do controle com água em relação ao crescimento da radícula são 0,05, 0,2 e 0,3 mg, conforme apresentado no quadro 7. Desta forma, a concentração 0,05 mg já é suficiente para alterar o crescimento da radícula. A concentração 0,025 mg também foi diferente do controle, mas não apresentou comportamento uniforme entre suas repetições, gerando dúvidas com relação à interpretação dos resultados.

Em relação ao hipocótilo, como as repetições do controle com água não tiveram comportamento uniforme, não é possível afirmar que há diferença estatística entre os tratamentos. Este resultado, entretanto, não invalida a atividade alelopática já apresentada pelo EBCO sobre o crescimento da radícula, fato suficiente para inviabilizar o crescimento da plântula. O quadro 7 traz os dados para a análise.

QUADRO 7 – TESTE SCOTT-KNOTT PARA CRESCIMENTO DE SEMENTES (*Lactuca sativa*) TRATADAS COM EBCO

EBLE - HIPOCÓTILO			EBLE - RADÍCULA		
TRAT	RESULTADO	GRUPO	TRAT	RESULTADO	GRUPO
171	10.200.000	a1	171	4.600000	a1
164	10.300.000	a1	163	4.727273	a1
114	11.800.000	a1	164	5.200000	a1
<u>102</u>	<u>11.900.000</u>	<u>a1</u>	161	5.400000	a1
163	12.000.000	a1	162	5.444444	a1
133	12.600.000	a1	151	5.900000	a1
143	12.900.000	a1	172	6.000000	a1
141	13.000.000	a1	173	6.100000	a1
151	13.300.000	a1	152	6.800000	a1
142	13.800.000	a1	154	7.300000	a2
174	13.900.000	a1	174	7.500000	a2
173	14.100.000	a1	153	8.100000	a2
144	14.100.000	a1	134	8.200000	a2
153	14.200.000	a1	133	8.400000	a2
154	14.300.000	a1	144	8.600000	a2
172	14.500.000	a1	132	8.700000	a2
132	14.700.000	a1	143	9.600000	a2
161	14.800.000	a1	141	9.700000	a2
131	14.800.000	a1	131	9.800000	a2
152	15.200.000	a1	142	10.300000	a2
162	15.444.444	a1	111	13.000000	a3
111	16.000.000	a2	114	13.300000	a3
113	16.000.000	a2	124	14.300000	a3
122	16.200.000	a2	<u>102</u>	<u>14.400000</u>	<u>a3</u>
<u>103</u>	<u>16.400.000</u>	<u>a2</u>	112	15.000000	a3
112	16.800.000	a2	113	15.200000	a3
124	17.300.000	a2	122	15.200000	a3
134	17.900.000	a2	123	15.500000	a3
123	18.700.000	a2	121	16.600000	a3
121	18.900.000	a2	<u>103</u>	<u>19.400000</u>	<u>a4</u>
<u>101</u>	<u>19.000.000</u>	<u>a2</u>	<u>104</u>	<u>21.300000</u>	<u>a4</u>
<u>104</u>	<u>21.000.000</u>	<u>a2</u>	<u>101</u>	<u>22.500000</u>	<u>a4</u>

LEGENDA: TRAT= Tratamento: XYZ, onde X= 1 corresponde a EBCO, Y é a concentração (de controle com água =0 a 0,025 mg =7) e Z é a repetição (1 a 4). Os tratamentos correspondentes à água estão sublinhados.

O terceiro elemento avaliado no sexto dia de incubação para análise de efeito sobre crescimento é o folíolo. O controle com água permitiu o crescimento de 100 dos folíolos, enquanto que as únicas concentrações de extrato em que ocorreu crescimento foram 0,4 mg EBCO (7,5), 0,1 mg EBCO (5), 0,3 mg EBLE (5), 0,1 mg EBLE (5), 0,05 mg EBLE (2,5) e 0,025 mg (7,5). Os resultados indicam claramente que quase não houve formação de folíolos até o sexto dia de incubação.

A ausência de folíolo é suficiente para indicar atividade alelopática pois a plântula não é capaz de sobreviver sem fotossíntese.

5.8.1.2 Influência sobre a germinação

Com relação à germinação das sementes, observou-se que houve pouca influência dos extratos testados quando em comparação com o controle de água. Apesar de algumas concentrações terem inibido a germinação nos dois primeiros dias, a partir do terceiro, quase todas as sementes germinaram, não havendo mais diferença em relação ao controle.

A tabela 13 apresenta os dados para esta análise.

TABELA 13 – ANÁLISE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* APÓS SEIS DIAS INCUBADAS COM EBLE E EBCO, EM QUADRUPLICATA

EBCE							
C	0 , 6 m g	0 , 4 m g	0 , 3 m g	0 , 2 m g	0 , 1 m g	0,05 mg	0,025 mg
M 10,0±0	9,8 ± 0,25	9,5 ± 0,3	10,0 ± 0	9,8 ± 0,25	10,0 ± 0	10,0 ± 0	9,8 ± 0,25

E		B		C		O	
C	0 , 6 m g	0 , 4 m g	0 , 3 m g	0 , 2 m g	0 , 1 m g	0,05 mg	0,025 mg
M 10,0±0	9,3 ± 0,25	10,0 ± 0	9,8 ± 0,25	9,8 ± 0,5	10,0 ± 0	9,3 ± 0,5	10,0 ± 0

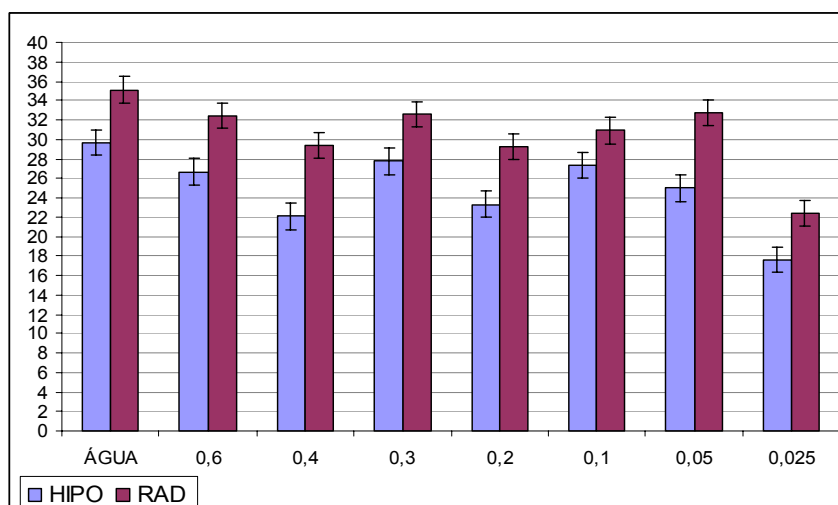
LEGENDA: M= Média± desvio padrão; C = Controle com água

5.11.2 Avaliação da atividade alelopática da tiramina

5.11.2.1 Influência sobre o crescimento

A influência da tiramina sobre influenciou o crescimento de hipocótilo e radícula de sementes de *Lactuca sativa* pode ser observado no gráfico 2.

GRÁFICO 2 – INFLUÊNCIA DA TIRAMINA SOBRE O CRESCIMENTO DE HIPOCÓTILO E RADÍCULA DE SEMENTES DE *Lactuca sativa*



LEGENDA: HIPO=HIPOCÓTILO, RAD=RADÍCULA; cada coluna representa a média mais erro padrão de crescimento de dez sementes em quatro repetições.

Observa-se, pelo gráfico 2, que a concentração de tiramina que mais influenciou o crescimento tanto do hipocótilo quanto da radícula foi 0,025 mg. A análise estatística do quadro 8 revela, no entanto, que a única concentração que foi totalmente diferente do controle com água foi 0,6 mg para a radícula.

No que tange à influência da tiramina sobre o hipocótilo, observa-se que novamente o controle não apresentou resultados uniformes, tendo repetições nos dois grupos. Entretanto, observando-se o grupo de valores que deram origem ao quadro 8, vê-se que algumas sementes fungaram, tendo como crescimento “zero”. Todas estas sementes estavam em apenas um dos tratamentos controle água. Após esta análise, o resultado foi considerado discrepante, e apenas as três repetições localizadas no grupo a2 foram consideradas na análise. Assim, apenas a concentração 0,6 mg foi estatisticamente diferente do controle. Os resultados apresentados após análise estatística diferem dos encontrados no gráfico 2. Esta diferença ocorre porque o gráfico apresenta as médias das quatro repetições para cada tratamento, sem que haja comparação entre os valores.

QUADRO 8 – TESTE DE SCKOTT-KNOTT PARA HIPOCÓTILO E RADÍCULA DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* TRATADAS COM TIRAMINA

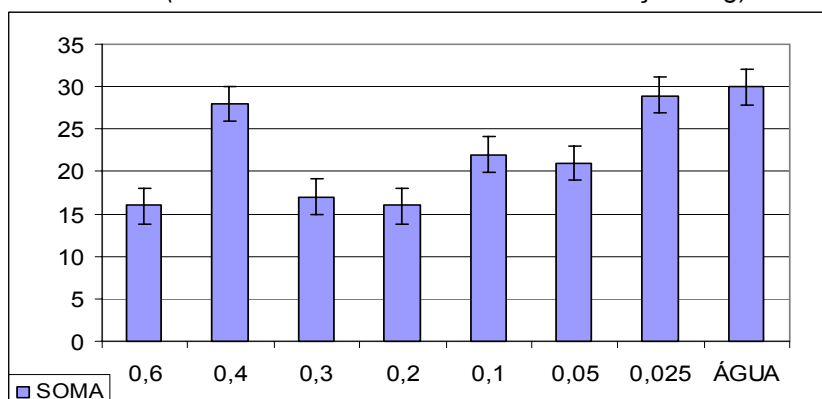
TIRAMINA – RADÍCULA			TIRAMINA - HIPOCÓTILO		
TRAT	RESULTADO	GRUPO	TRAT	RESULTADO	GRUPO
312	27.900.000	a1	<u>301</u>	<u>23.400.000</u>	<u>a1</u>
314	28.700.000	a1	312	21.400.000	a1
321	28.900.000	a1	313	23.300.000	a1
322	22.000.000	a1	321	19.400.000	a1
324	27.400.000	a1	322	17.300.000	a1
332	31.500.000	a1	324	19.800.000	a1
333	27.600.000	a1	343	23.500.000	a1
342	30.100.000	a1	344	23.000.000	a1
343	27.200.000	a1	353	23.800.000	a1
344	22.700.000	a1	354	22.800.000	a1
351	30.900.000	a1	363	23.800.000	a1
352	27.000.000	a1	364	22.500.000	a1
353	27.100.000	a1	371	20.300.000	a1
363	27.700.000	a1	372	18.100.000	a1
364	29.500.000	a1	373	14.300.000	a1
371	30.600.000	a1	374	16.000.000	a1
372	26.100.000	a1	<u>302</u>	<u>28.900.000</u>	<u>a2</u>
373	14.400.000	a1	<u>303</u>	<u>28.900.000</u>	<u>a2</u>
374	26.300.000	a1	<u>304</u>	<u>28.600.000</u>	<u>a2</u>
<u>301</u>	<u>32.400.000</u>	<u>a2</u>	311	33.300.000	a2
<u>302</u>	<u>33.500.000</u>	<u>a2</u>	314	26.000.000	a2
<u>303</u>	<u>36.000.000</u>	<u>a2</u>	323	29.500.000	a2
<u>304</u>	<u>38.600.000</u>	<u>a2</u>	331	27.800.000	a2
311	40.000.000	a2	332	28.300.000	a2
313	33.200.000	a2	333	26.300.000	a2
323	39.300.000	a2	334	28.500.000	a2
331	32.600.000	a2	341	30.900.000	a2
334	38.700.000	a2	342	24.800.000	a2
341	36.900.000	a2	351	26.800.000	a2
354	38.700.000	a2	352	26.400.000	a2
361	35.200.000	a2	361	26.800.000	a2
362	41.500.000	a2	362	26.400.000	a2

LEGENDA: TRAT= Tratamento: XYZ, onde X= 3 corresponde à tiramina, Y é a concentração (de controle com água =0 a 0,025 mg =7) e Z é a repetição (1 a 4). Os tratamentos correspondentes à água estão sublinhados.

Os valores 0,1, 0,2 e 0,4 mg também são diferentes do controle para radícula, mas uma repetição está classificada como semelhante ao tratamento água, podendo gerar dúvidas quanto à interpretação dos dados. Neste estudo, estamos considerando apenas as quatro repetições no mesmo grupo como resultado positivo para atividade alelopática.

A tiramina também afetou a formação de folíolos, especialmente as concentrações 0,6, 0,3 e 0,2 mg, como pode observado no gráfico 3.

GRÁFICO 3 – INFLUÊNCIA DA TIRAMINA NO DESENVOLVIMENTO FOLÍOLOS DE SEMENTES *Lactuca sativa* (NÚMERO FOLÍOLOS X CONCENTRAÇÃO mg)



LEGENDA: cada coluna representa a média mais erro padrão de crescimento de dez sementes em quatro repetições.

Quando estes dados são levados à análise estatística por ANOVA, verifica-se que o valor de $P < 0,01$ e que F crítico é menor que F calculado. Isto significa que os dados são estatisticamente diferentes e que a hipótese de que não há diferença entre os tratamentos pode ser rejeitada com 99 de confiança. A análise por Skott-Knott está no quadro 9.

QUADRO 9 – TESTE DE SCKOTT-KNOTT PARA FOLÍOLOS DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* TRATADAS COM TIRAMINA

TIRAMINA - FOLÍOLO					
TRAT	RESULTADO	GRUPO	TRAT	RESULTADO	GRUPO
311	0.400000	a1	<u>301</u>	<u>0.700000</u>	<u>a2</u>
312	0.100000	a1	<u>302</u>	<u>0.800000</u>	<u>a2</u>
313	0.500000	a1	<u>303</u>	<u>0.900000</u>	<u>a2</u>
324	0.500000	a1	<u>304</u>	<u>0.700000</u>	<u>a2</u>
331	0.500000	a1	314	0.600000	a2
332	0.300000	a1	321	0.900000	a2
333	0.500000	a1	322	0.700000	a2
334	0.400000	a1	323	0.700000	a2
341	0.400000	a1	342	0.600000	a2
343	0.400000	a1	352	0.800000	a2
344	0.200000	a1	354	0.700000	a2
351	0.300000	a1	363	0.700000	a2
353	0.400000	a1	371	1.000.000	a2
361	0.500000	a1	372	0.600000	a2
362	0.400000	a1	373	0.900000	a2
364	0.400000	a1	-	-	-
374	0.400000	a1	-	-	-

LEGENDA: TRAT= Tratamento: XYZ, onde X= 3 corresponde à tiramina, Y é a concentração (de controle com água =0 a 0,025 mg =7) e Z é a repetição (1 a 4). Os tratamentos correspondentes à água estão sublinhados.

Observa-se que o tratamento 0,3 mg foi o único completamente diferente do controle água. Como ocorreu anteriormente, as diferenças entre o gráfico 3 e o teste de Scott-Knot se devem ao tipo de comparação feita com os dados; no gráfico 3 estão os valores, sem comparação entre os tratamentos. Assim, o tratamento 0,3 mg de tiramina deve ser considerado o mais influente sobre o crescimento de folíolo.

5.11.2.2 Influência sobre a germinação

Assim como foi observado com os extratos brutos de *Cereus jamacaru*, a germinação das sementes incubadas com tiramina não foi diferente do controle com água. Isto pode ser observado na tabela 14.

TABELA 14 – ANÁLISE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* APÓS SEIS DIAS INCUBADAS COM TIRAMINA, EM QUADRUPLICATA

		TIRAMINA						
	C	0,6 mg	0,4 mg	0,3 mg	0,2 mg	0,1 mg	0,05 mg	0,025 mg
M	95 ± 0,25	98 ± 0,2	9,8 ± 0,2	10,0 ± 0	10,0 ± 0	9,8 ± 0,2	10,0 ± 0	9,8 ± 0,2

LEGENDA: M= Média de sementes germinadas e desvio padrão; C= controle com água.

Mesmo sem afetar a germinação, a tiramina apresenta atividade alelopática sobre sementes de *Lactuca sativa* por inibir seu crescimento, afetando o crescimento da radícula, do hipocótilo e do folíolo.

A atividade apresentada pela tiramina foi menor que a dos extratos brutos de *Cereus jamacaru*. O extrato bruto de lenho (EBLE) foi capaz de inibir o crescimento de sementes de *L. sativa* com menor concentração (0,025 mg inibiram o desenvolvimento da radícula) e EBCO e EBLE inibiram o desenvolvimento de folíolos com 0,025 mg (a tiramina teve ação apenas com 0,3 mg). O comportamento em relação à germinação foi semelhante para as três amostras (tiramina, EBLE e EBCO).

Assim como o sugerido para a atividade antimicrobiana, é esperado que a atividade alelopática do extrato seja maior que a da substância pura. Isto acontece porque a planta possui diversas substâncias, que mesmo em concentrações não detectáveis, podem influenciar o desenvolvimento de outros seres.

6 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico de *Cereus jamacaru* levou ao isolamento de nitrato de sódio no córtex e no lenho e também na amostra comercial; foram 2,5 g na amostra comercial, 6,5 g do lenho e 2,9 g do córtex, que correspondem a 0,18, 0,28 e 0,32 % do material vegetal.

Foram isolados 19,3 mg de β -sitosterol a partir da fração hexano do extrato de lenho e identificados por ^{13}C - RNM. Um precipitado (6,5 mg) foi isolado da mesma fração e a análise por CG indicou que estavam impuros, mas que o principal constituinte provavelmente seja o β -sitosterol. Foi identificado o β -sitosterol como maior constituinte das frações hexano do extrato de córtex.

Foi desenvolvido método para quantificação da série homóloga tirosina, tiramina e hordenina e para a semiquantificação de N-metiltiramina por CLAE. Durante as análises, a N-metiltiramina e hordenina foram identificadas pela primeira vez na espécie. A síntese de N-metiltiramina comprovou o tempo de retenção e possibilitou a sugestão da rota metabólica para a produção das aminas em *Cereus jamacaru*.

Após análise das amostras, a tiramina foi a substância predominante no lenho (28,41 mg em 100 g de vegetal seco); na amostra comercial e no córtex foi a N-metiltiramina (1,33 mg em 100 g de córtex seco e 238,1 mg em 100 g de planta comercial seca). Estas duas aminas podem ser consideradas marcadoras da espécie, podendo estar na forma glicosilada. A hidrólise ácida seguida de extração básica em solvente orgânico foi o método mais eficiente para a liberação de aminas.

Os extratos brutos de córtex e de lenho apresentaram atividade antimicrobiana sobre os microorganismos testados. Os melhores resultados foram 44,47 mg/mL de EBLE inibiram o crescimento de *P. aeruginosa* e de *P. mirabilis*. EBCO inibiu o crescimento de *S. epidermidis* com 3,04 mg/mL, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* com 6,09 mg/mL e *P. mirabilis* com 12,17 mg/mL. A tiramina apresentou atividade antimicrobiana em altas concentrações (1000 $\mu\text{g/mL}$); uma vez que sua concentração nos extratos é cerca de cinco vezes menor, esta substância provavelmente não é a responsável pela atividade apresentada pelos extratos.

Com relação à atividade alelopática, os extratos brutos influenciaram negativamente o crescimento de sementes de *Lactuca sativa* por inibir especialmente o folíolo com a menor concentração (0,025 mg). EBCO teve atividade com 0,05 mg sobre a radícula; EBLE influenciou a radícula com 0,025 mg e 0,2 mg para o hipocótilo. A tiramina apresentou atividade sobre o crescimento do hipocótilo (0,6 mg) e folíolo (0,3 mg), podendo ser responsável por parte da atividade apresentada pelos extratos. Nem a tiramina, nem os extratos influenciaram a germinação das sementes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando inserido no contexto da produção de fitoterápicos, este representa os primeiros passos para a inclusão de *Cereus jamacaru* na terapêutica. As substâncias identificadas nesta pesquisa podem ser um guia para o direcionamento de estudos posteriores, especialmente na área da farmacologia e da toxicologia.

No que tange à presença de nitrato de sódio, deve-se considerar que alguns compostos nitrogenados, como o nitrito e o nitroprussiato de sódio já apresentaram atividade antimicrobiana (RYU e LLOYD, 1995, p. 183-188). No organismo, os nitratos orgânicos são vasodilatadores utilizados especialmente para o tratamento da angina; agem pelo relaxamento da musculatura lisa promovido pelo aumento de GMPc pela produção intracelular de NO (RANG, DALE e RITTER, 1997, P. 233-234). Em sendo o sal predominante no *Cereus jamacaru*, é possível que os compostos básicos estejam solvatados no meio ligados aos ânions nitratos.

O β -sitosterol é amplamente difundido na natureza, presente em muitos alimentos; a ele já foram atribuídas diversas atividades, como antiinflamatória (PARK *et al.*, 2000, p.289), antimicrobiana (BELTRAME *et al.*, 2002, p. 4) e antinociceptiva (SANTOS *et al.*, 1995, p.329-332). Sua importância como marcador é conhecida, sendo o principal esteróide das Cactáceas. Os estudos por CG não possibilitaram a identificação de alguns esteróides na fração hexano de córtex de *C. jamacaru*. Estudos futuros devem utilizar outras metodologias, como CG-EM para identificação e posterior quantificação destes compostos.

Após o processo de síntese da N-metiltiramina, verificou-se a presença de hordenina. Em estudo futuros, sugere-se que seja realizada etapa de purificação da imina para que o produto final apresente pureza suficiente para que seja considerada

substância de referência para quantificação. Na metodologia apresentada apenas foi possível a semiquantificação desta substância.

Dentre as aminas encontradas - tiramina, N-metiltiramina e hordenina – esta última destaca-se por estar presente em muitos cactos alucinógenos. É importante ressaltar que a hordenina também está presente em muitas famílias de vegetais, e que é encontrada na cevada e na vegetação de pastagens; por esta razão muitos estudos sobre o efeito da substância na alimentação do gado e de eqüinos são encontrados (HAPKE e STRATHMANN, 1995, p. 228-232). Também está presente na cerveja. Na medicina chinesa, a planta *Citrus aurantium* é utilizada em regimes de emagrecimento; na composição de algumas preparações comerciais há 0,33 % de hordenina (NATURAL HEALTH PRODUCTS, 2005).

A presença de tiramina foi confirmada com este estudo. Nos vegetais, a tiramina ligada ao ácido cinâmico ou derivados é responsável pela cicatrização em caso de ferimentos ou à resistência antifúngica. Isto acontece porque estas estruturas formam uma barreira fenólica na parede celular do vegetal, tornando-as mais resistentes a hidrólises enzimáticas (NEGRELL, POLLET e LAPIERRE, 1996, p. 1195). Além disso, alguns estudos indicam que a tiramina sofre polimerizações oxidativas e adere fortemente à parede celular, tornando-a mais resistente.

Muitas etapas são ainda necessárias para a produção do medicamento a partir de *Cereus jamacaru*, como por exemplo a validação da metodologia proposta para o controle de qualidade. Alguns fatores devem ser considerados, como a robustez do método, que se mostrou sensível ao tempo de preparo da fase móvel e a linearidade e o limite de detecção dos padrões nas condições propostas. Certamente, este será o próximo passo.

Com o objetivo principal de viabilizar o uso de plantas brasileiras para fins medicinais, este estudo indica substâncias marcadoras da espécie e propõe

metodologia para controle de qualidade. As atividades biológicas testadas são formas aplicadas da fitoquímica que têm como objetivo final o manejo sustentável da agricultura de plantas medicinais.

Desta forma, este estudo colabora com a cadeia produtiva do fitoterápico, pois fornece informações relevantes sobre a composição e o controle de qualidade da planta, abrindo um universo de possibilidades.

REFERÊNCIAS

AGURELL, S; LUNDSTRÖM, J; MASOUD, Cataceae alkaloids VII: alkaloids of *Echinocereus merkeri*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 58, n. 11, p. 1413-1414. Nov-1969.

ARAGÃO, T. C. F. R.; SOUZA, P. A. S.; UCHÔA, A. F.; COSTA, I. R.; BLOCH Jr, C; CAMPOS, F. A. P. Characterization of a methionine-rich protein from the seeds of *Cereus jamacaru* Mill (Cactaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33(8), p. 897-903. 2000.

BARTHLOTT, W; HUNT. DR. Cactaceae. In: **The families and genera of vascular plants, v. II flowering plants – Dicotyledons**. KUBIZTKI, K; ROHWER, JG; BITTRICH, V. Berlin: Springer-Verlag, p. 161-197. 1993.

BELTRAME, F.L.; PESSINI, G.L.; DORO, D.L.; FILHO, B.P.D; BAZOTTE, R.B.; CORTEZ, D.A.G. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus scyoides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 45, n. 1. Curitiba, mar-2002. Disponível em <www.scielo.br> Acesso em 14 jan 2005.

BHATTACHARYYA, S. Borohydride reductions in dichloromethane: a convenient, environmentally compatible procedure for the methylation of amines. **Synthetic Communications**. v. 24, n. 14, p. 2061-2069. 1995.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Editora Universitária da UFRN, 4.ed, [sd]. p. 156.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada No. 17, de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Revoga a Portaria no. 6/95. Disponível em: <http://www.acj.ufrj.br/consumo/legislacao/n_rdc17_00.htm> Acesso em: 28 jun. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada No. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Revoga a RDC no. 17/00. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>> Acesso em: 25 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei No. 6360, de 23 de setembro de 1976 . Dispõe sobre a vigilância a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/6360_76.htm> Acesso em: 28 jun. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no. 6/MS/SNVS, de 31 de janeiro de 1995. Institui e Normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/6_95.htm > Acesso em: 28 jun. 2002.

BRHUN, J; AGURELL, S. Cactaceae Alkaloids XVIII: two new alkaloids from *Coryphantha calipensis* H. Bravo. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 63, n. 4, p. 574-576, 1974.

BRHUN, J; LINDGREN, J. Cactaceae Alkaloids XXIII: alkaloids of *Pachycereus pectin-aboriginum* and *Cereus jamacaru*. **Lloydia**, v. 39, n. 2 -3. Mar-Apr, May-Jun, p.175-177, 1976.

BRITTON, N.; ROSE, J. **The Cactaceae: descriptions and illustrations of plants of the cactus family**. V. I e II. NY: Dover Publications. [1919]. p. 3-23; 197-209.

BURRET, F; LEBRETON, P; VOIRIN, B. Les aglycones flavoniques de Cactées: distribution, signification. **Journal of Natural Products**. v. 45, n. 6, p. 687-693. Nov-Dec, 1982.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R., Brassicaceae**. Curitiba: 2002. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CHEN, C.Y., CHANG, F.R.; YEN, H.F.; WU, Y.C. Amides from stems of *Annona cherimola*. **Phytochemistry**. v. 49, n. 5. p. 1443-1447. 1998.

COMELLAS, L.; TOMÁS, J.M.A. **Desarrollo de métodos en HPLC**. Cromatografía Merck, 2002.

COSTA, SC. **Cacto *Cereus peruvianus*: características estruturais, reológicas e aplicações dos polissacarídeos**. Curitiba: 1997. 202 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. NY: Columbia University Press. 1981.

CRUZ, ME; NOZAKI, MH; BATISTA, MA. **Plantas medicinais e alelopatia**. Sociedade de Olericultura do Brasil, 2001. Disponível em: <<http://www.horticiencia.com.br/news/news2.asp?id=300>> Acesso em: 06 jul. 2004.

DE-EKNAMKUL, W.; POTDUANG, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**. v. 62, p. 389-398. 2003

DINGERDISSE, JJ; MCLAUGHLIN, JL. Cactus Alkaloids XXI: β -Phenethylamines from *Dolichothele sphaerica*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 62, n. 10, p. 1633-1666. Oct 1973.

Farmacopéia Brasileira 4 ed, parte I, p. V.2.11.1,V.2.11.2, V.4.2.1, São Paulo, 1991.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados**. Pacote computacional. DEX/UFLA, Lavras, 2000.

FERRIGNI, N.R. *et al.* Identification of new cactus alkaloids in *Backergia militaris* tandem mass spectrometry. **Journal of Natural Products**. v. 47, n. 5, p. 839-845. Sep-Oct 1984.

GALATI, E.M. MENDELLO, M.R.; GIUFFRIDA, D.; MICELI, N. Anticulcer activity of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultra structural study. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 76, n. 1, p. 1-9. Jun 2001.

GOODMAN; GILMAN. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. NY: McGraw-Hill, 1996. p. 200-224.

HANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997.

HAPKE, H.J.; STRATHMANN, W. Pharmacological effects of hordenine. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**. v. 102, n. 6, p. 228-232. Jun-1995.

HENRIQUES, A.T.H.; KERBE, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre e Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS e Editora da UFSC, 2000.

HENRY, T.A. **The plant alkaloids**. 4. ed. Londres: J&A Churchill Ltd., 1949.

HIGUCHI, T. **Biochemistry and molecular biology of wood**. Berlim: Springer Publishing Co., 1997.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1985.

KIRCHER, HW. Triterpenes in organ pipe cactus. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2707-2712. 1980.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 2 ed. Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda : São Paulo, 1993.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. Editora Guanabara: Rio de Janeiro, 1988.

LEE, JC *et al.* Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 50, n. 22, p. 6490-696. 23 oct 2002.

LIN, R.C.; SEGUIN, E.; TILLEQUIN, F; KOCH, M. New alkaloid glycosides from *Selaginella doederleinii*. **Journal of Natural Products**. v. 50, p. 422-426, 1987.

LIN, R.C.; PEYROUX, J.; SEGUIN, E.; KOCH, M. Hypertensive effect of glycosidic derivatives of hordenine isolated from *Selaginella doederleinii* Hieron and structural analogues in rats. **Phytotherapy Research**, v. 5, p. 188-190, 1991.

LIU, H.; LOVETT, J. Biologically active secondary metabolites of barley. II. Phytotoxicity of barley allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 10, p. 2231-2244, 1993.

LOGGIA, R.D. **Piante officinali per infuse e tisane**. 3 ed. Organizzazione Editorale Medico Farmacêutica, 1993. p. 354

LORENZY, H.; MATOS, F.J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa - Instituto Plantarum, 2002. p. 109.

MAFFEI, M; MEREGALLI, M; SCANNERINI, S. Chemotaxonomic significance of surface wax n-alkanes in the Cactaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n.3, p. 241-253. 1997.

MABRY, T.J. *et al*, **The systematic identification of flavonoids**. Springer-Verlag, Berlin, 1970. p. 4-14

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1995.

MAYWORM, M.; SALATINO, A. Teores de óleo e composição de ácidos graxos de sementes de *Cereus jamacaru* DC (Cactaceae), *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) e *Anadenanthera colubrina* (Benth) Brenan var *cebil* (Griseb.) Von Altschul. (Mimosaceae). **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 15, p.201-209. 1996.

MEDEIROS, J.; SATHLER, M.; GÓIS, F. Comparação de diferentes tipos de embalagens para o armazenamento de sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.). **Boletim Técnico Científico da Escola Superior de Agricultura de Mossoró & Departamento de Engenharia Agrícola**. Mossoró, RN. 1994. 11p.

MEYER, BN; MCLAUCHLIN, JL. Cactus Alkaloids XLI: candicine from *Trichocereus pasacana*. **Planta Medica**. v. 38, p. 91-92. Jan-1980.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

MINDT, L.; SAAG, K.; SANDERSON, G.R.; MOYNA, P.; RAMOS, G. Cactaceae mucilage composition. **Journal of Science in Food Agriculture**. v. 26, p. 993-1000. 1975.

MONJE, P.; BARAN, E. First evidence of the bioaccumulation of α -quartz in Cactaceae. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 457-460. 2000.

MOREIRA, E.A. Marcha Sistemática de Análise em Fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**. Curitiba, v. 47, n. 1, p. 3-19. 1979.

NATURAL HEALTH PRODUCTS. Disponível em: <www.naturalhealthproducts.ca/productmonograph_gofigure.html> Acesso em: 20 jan 2005.

NEAL, JM *et al.* Cactus alkaloids X: Isolation of hordenine and N-methyltyramine from *Ariocarpus kotschoubeyanus*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 60, n. 3. p. 477-488. Mar-1971.

NEGREL, J.; POLLET, B.; LAPIERRE, C. Ether-linked ferulic amides in natural and wound periderms of potato tuber. **Phytochemistry**. v. 43, n. 6. p. 1195-1199. 1996

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. Disponível em: <<http://www.nist.gov>> Acesso em: 10 ago 2004.

OMNI CYBER. **Mapa de distribuição de famílias**. Disponível em: <<http://www.omnicyber.org/Bio/Families/FamIndex.html>> Acesso em: 28 mar. 2004.

PARK, E; CHUN, M. Wound healing activity of *Opuntia ficus-indica*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 165-167. 2001.

PARK, E.; KAHNG, J; LEE, S; SHIN, K. An anti-inflammatory principle from cactus. **Fitoterapia**, v. 72, p. 288-290, 2000.

PEITZ C. **Estudo fitoquímico, alelopático e antimicrobiano de *Acacia longifolia* Andr. (Willd.)**. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

PELLATI, F. *et al.* Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantiim* L. var. *amara* by LC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 29, p. 1113-1119. 2002.

PETERSHOFER-HALBMAYER, H *et al.* Isolation of hordenine (cactine) from *Selenicereus grandiflorus* (L.) Britt. & Rose and *Selenicereus pteranthus* (Link & Otto) Britt. & Rose. **Scienia Pharmaceutica**, v. 50, p. 29-34, 1982.

PROJETO CACTACEAS BRASILEIRAS. **Mandacaru**. Disponível em: <www.brcactaceae.org> Acesso em: 24 mar. 2004.

PUMMANGURA, S; MCLAUGHLIN, J.L.; SCHIFFERDECKER, R.C. Cactus alkaloids XLVII: β -phenethylamines from the "missouri pincushion", *Coryphantha (neobessya) missouriensis*. **Journal of Natural Products**. v.44, n. 5. p. 614-616. Set-Out. 1981.

QIU, Y.; CHEN, Y.; PEI, Y.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Constituents with radical scavenging effect from *Opuntia dillenii*: structures of new α -pyrones and flavonol glycoside. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 50, n. 11, p. 1507-1510. Tokyo, 2002.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 1997.

REIS, M.S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre e Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS e Editora da UFSC, 2000. p. 41-62.

ROMEIRO R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV. 2001. 279p.

RYU, J.S.; LLOYD, D. Cell toxicity of sodium nitrite, sodium nitroprusside and Rossium-s black salt against *Thricomonas vaginalis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 130, p. 183-188. 1995.

SALT, TA; TOCKER, JE; ADLER, JH. Dominance of Δ^5 -sterols in eight species of the Cactaceae. **Phytochemistry**, v. 26, n. 3, p. 731-733. 1987.

SALVATORE, R.N.; YOON, C.H.; JUNG, K,W. Synthesis of secondary amines. **Tetrahedron**, v. 57. p. 7785-7811. 2001.

SANDS, L.; KLAAS, R. The composition of cholla gum I. The isolation of L-arabinose, D-galactose and L-rhaminose. **Journal of the American Chemical Society**, v.51. p. 3441-3446. 1929.

SANTOS, A.R.S.; NIERO, R.; CEQUINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; PIZZOLATTI, M.G.; MONACHE, F.D.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Medica**, v. 61. p. 329-332. 1995.

SCHEINVAR, L. Cactáceas. **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí. 1985.

SIERRA, M; PESSOA, C. Super Zoom. **Revista Superinteressante**. São Paulo: Ed. Abril, p. 88-90. Set-2003.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan, 1994. 387p

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R . **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 2. ed. Porto Alegre e Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS e Editora da UFSC, 2000.

SOARES, GLG; VIEIRA, TR. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. "grand rapids") por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, v. 7, n.1, p. 180-197. jan/dez 2000.

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography**, 2. ed. New York ,1969.

STADLER REFERENCE SPECTRA. Philadelphia: Stadler Research Laboratories, Inc. 1972

STARCHA, R; CHYBIDZIUROVÁ, A; LACNÝ, Z. Alkaloids of the genus *Turbinicarpus* (Cactaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 839-841, 1999.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 88, n. 1, p. 41-54. Nov-2003.

TAN, M.L. *et al.* Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, n. 1-2, p. 287-294. Jan-2005.

THE MERCK INDEX. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12 ed, EUA .1996.

VALENTE, L.; SILVA, G.; ANTUNES, A. P; SANTOS, F. A. L.; SIANI, A. C.; TAPPIN, M. R. R.; SANTOS, R.; SOARES, R. O. A.; FERREIRA, E.; GIBALDI, D.; MAZZEI, J. L.; SHEINVAR, L. A. Evidência de alcalóides feniletilamínicos e bioatividade de três espécies de Cactáceas brasileiras. **Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia – SP, p. 122, 1998.

WAGNER, H; GREVEL, J. New cardioactive drugs II, detection and isolation of cardiotonic amines with ionpair-HPLC. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 44, p. 36-40, 1982.

WATERS, LC School. **Diagnóstico e resolução de problemas em HPLC**. São Paulo, 2003.

ZENTENO, E; DEBRAY, H; MONTREUIL, J. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereus eruca*. **FEBS Letters**. v. 238, n. 1, p. 95-100. 26 Sep 1988.